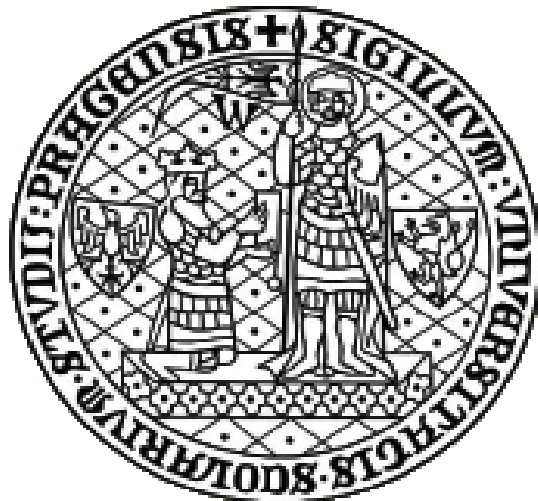


UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ODDĚLENÍ ZOOLOGIE



Kristýna Kaňoková

**Spermatogeneze, klasifikace a hodnocení morfologie spermií pro
využití v asistované reprodukci**

**Spermatogenesis, Classification and Evaluation of Sperm
Morphology for Assisted Reproduction**

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Hortová, PhD

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci „Spermatogeneze, klasifikace a hodnocení morfologie spermií pro využití v asistované reprodukci“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 05. 2011

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Hortové PhD. za její neuvěřitelnou trpělivost, ochotu, podporu a odborné vedení práce. Dále děkuji své rodině a příteli za podporu a pomoc při tvorbě bakalářské práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk	
Abstrakt a klíčová slova	
Abstract and key words	
1. Cíle práce	- 9 -
2. Úvod.....	- 10 -
3. Spermatogeneze	- 11 -
3.1. Rozmnožovací fáze	- 12 -
3.2. Růstová fáze	- 12 -
3.3. Zrací fáze (diferenciační)	- 13 -
4. Morfologie spermie.....	- 14 -
4.1. Obecná morfologie savčí spermie	- 14 -
4.1.1. Hlavička spermie	- 15 -
4.1.2. Krček – spojovací část	- 17 -
4.1.3. Bičík spermie	- 17 -
4.1.4. Plazmatická membrána.....	- 19 -
4.2. Definice normální lidské spermie dle norem WHO.....	- 19 -
4.3. Klasifikace patologické spermie dle norem WHO.....	- 21 -
4.4. Patologie vedoucí k asistované reprodukci	- 22 -
4.4.1. Nedostatečný počet spermií v ejakulátu - oligospermie	- 22 -
4.4.2. Nepřítomnost spermií v ejakulátu - azospermie	- 25 -
4.4.3. Nepohyblivost spermií - asthenozoospermie.....	- 26 -
4.4.4. Patologická morfologie spermií - teratozoospermie.....	- 27 -
4.4.5. Další formy patologií.....	- 27 -
5. Klasifikace a hodnocení morfologie lidských spermií a jejich využití v metodách asistované reprodukce	- 28 -
5.1. Intrauterinní administrace spermií – IUI.....	- 28 -
5.2. Intracytoplazmatická injekce spermie ICSI	- 31 -
5.3. <i>In vitro</i> fertilizace - IVF	- 34 -
6. Závěr	- 38 -
7. Použitá literatura	- 40 -

Seznam použitých zkratk

AR – Androgenní Receptor

ART – Asistenčně Reprodukční Technologie

AZF – Azoospermický Faktor

BMP8b – Bone Morphogenetic Protein 8b

ERC – Excess Residual Cytoplasm – nadměrná zbytková cytoplazma

FSH – Folikuly Stimulující Hormon

FSP – Fallopian tube Sperm Perfusion – průtok spermií vejcovody

GNDF - Glial cell-Derived Neurotrophic Factor – neurotrofický faktor pocházející z gliální linie

GnRH – Gonadotropin Releasing Hormon – gonadotropiny uvolňující hormon

H1FNT - H1 histone Family, member N, Testis-specific – histon podílející se na nahrazení histonů protaminy

hCG – Human Chorionic Gonadotropin – lidský choriový gonadotropin

ICR – Imprinting Control Region – kontrolní oblast imprintingu

ICSI – Intracytoplasmic Sperm Injection . intracytoplazmatická injekce spermie

IM – Imotility - nepohyblivost

IUI – Intrauterinní Inseminace / intrauterinní administrace spermií

IVF – In Vitro Fertilizace

KET – Kryoembryotransfer

LH – Luteinizační Hormon

MESA – Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration – aspirace spermií z nadvarlat

NOA – Neoobstrukční Azoospermie

NP – Neprogresivní Pohyblivost

OA – Obstrukční Azoospermie

PESA – Percutaneous Sperm Aspiration – perkutánní (procházející kůží) aspirace spermií z nadvarlat

PR – Progresivní pohyblivost

SCO – Sertoli-Cells-Only Syndrom

SRY – Pohlaví determinující faktor Y

TESA – Testicular Sperm Extraction – aspirace spermií z varlat

Tnp1 a **Tnp2** – Transition Protein – přechodné proteiny 1 a 2

TTP – Time To Pregnancy – počet menstruačních cyklů před úspěšným otěhotněním *in vivo*

WHO – World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

Spermatogeneze, klasifikace a hodnocení morfologie spermií pro využití v asistované reprodukci

Abstrakt

Kvalita spermií hraje důležitou roli při stanovení mužské plodnosti. Vzhledem k narůstajícímu poklesu kvality spermií se vyskytuje stále více párů vyžadující metody asistované reprodukce. Morfologie spermií je jedním z faktorů ovlivňujících plodnost muže a defekty v morfologii spermií jsou hlavním předmětem řady studií.

Savčí spermie jsou tvořeny v průběhu spermatogeneze a vady ve spermatogenezi mohou způsobit vážné defekty na morfologii spermií. Defekty hlavičky, krčku nebo bičíku spermie mohou mít vážné dopady na oplodňující schopnosti spermie a proto v některých případech je nutné využít metody asistované reprodukce vzhledem k morfologickým abnormalitám.

Cílem této práce bylo popsat spermatogenezi, morfologii spermie normální a patogenní a zhodnotit použití a výsledky metod asistované reprodukce v rámci morfologie spermií a případně je uplatnit při výběru metody asistované reprodukce.

Morfologie spermií ovlivňuje do určité míry výsledky asistované reprodukce a je nezanedbatelným faktorem ovlivňujícím podíly úspěšnosti oplození, otěhotnění a vývoje embrya. V případech vážné patologie se však nedá doporučit využití metod asistované reprodukce, neboť defekty ve spermatogenezi následně odrážející se ve špatné morfologii spermie mohou vést k vážným chromozomálním abnormalitám ve spermiích a následně k aberantnímu genetickému potenciálu u potomků.

Klíčová slova: spermatogeneze, morfologie spermie, asistovaná reprodukce

Spermatogenesis, Classification and Evaluation of Sperm Morphology for Assisted Reproduction

Abstract

Sperm quality has an important role in determining male fertility. There is an increasing amount of couples searching for assisted reproduction due to the increasing decline in quality of sperm. Morphology of sperm is one of the factors influencing male fertility and defects in sperm morphology are the main subject of many studies.

Mammalian sperm are formed during spermatogenesis and defects in spermatogenesis may cause severe defects in sperm morphology. Defects of a sperm head, as well as a mid-piece and principal piece of sperm tail sperm can have a serious impact on fertilizing ability of sperm and it is, therefore, necessary in some cases to use methods of assisted reproduction due to morphological abnormalities.

The main objects of this thesis were to describe spermatogenesis, normal and pathogenic sperm morphology and evaluate the use and outcome of assisted reproduction methods based on sperm morphology and apply the evaluation in selecting the best method of assisted reproduction.

To some extent, sperm morphology influences the outcome of assisted reproduction and it is a significant factor in predicting fertilization, pregnancy and embryo cleavage/development rate. In some cases of severe pathology, the use of assisted reproduction methods cannot be recommended. The defects in spermatogenesis are subsequently reflected in poor sperm morphology and they could lead to serious chromosomal abnormalities in sperm and cause potential aberrant genetic development of offspring.

Key words: spermatogenesis, sperm morphology, assisted reproduction

1. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout v širším kontextu problematiku klasifikace a hodnocení morfologie spermií pro asistovanou reprodukci včetně zahrnutí standardního experimentálního myšího modelu, který je součástí základního výzkumu. Spermatogeneze, jakožto proces tvorby a vývoje spermií je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím morfologii spermatické buňky v pohlavních orgánech samce a proto popis jednotlivých stádií spermatogeneze je prvním cílem této práce.

Výsledkem spermatogeneze je spermatická buňka, a proto druhým cílem je detailní popis obecné morfologie spermie a následně rozdílů mezi normální a patologní spermií podle norem WHO – Světové zdravotnické organizace.

Morfologie spermatické buňky, a to jak vnější, která je rozpoznatelná ve světelném mikroskopu, tak i vnitřní struktura spermie, hraje důležitou roli při oplodnění a následné embryogenezi. Metody asistované reprodukce jsou většinou vyhledávány páry, které mají problém s otěhotněním. Morfologické poškození spermií může být jednou z příčin neplodnosti, proto třetím cílem této práce je shrnout poznatky ze spermatogeneze a morfologie normální a patologické samčí pohlavní buňky a aplikovat je pro klasifikaci výběru metod asistované reprodukce.

2. Úvod

Za posledních několik desetiletí byl zaznamenán výrazný pokles kvality spermií ve všech vyspělých zemích. Jelikož mužská plodnost souvisí s počtem spermií, výsledky mohou odrážet celkové snížení mužské plodnosti (Carlsen, Giwercman et al. 1992). Počet párů uchylujících se k metodám asistované reprodukce kvůli neplodnosti se výrazně zvýšil a plodnost (konečný počet dětí), prudce klesla. Částečně je pravděpodobně příčinou odkládání těhotenství na pozdější věk (Leridon and Slama 2008) a s tím spojené poklesy objemu spermatu, pohyblivosti a morfologie spermií spojené s věkem (Kuhnert and Nieschlag 2004).

U každého případu neplodnosti je pravděpodobnost, že problémy ze strany muže a ženy jsou v poměru 1:1, nicméně realita je odlišná. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je příčina neplodnosti páru jen na straně ženy pouze ve 25% případů. Mužský faktor samotný je za neplodnost odpovědný ve 33% a postižení obou partnerů najednou se vyskytuje ve 20%. Příčinu neplodnosti se při základním vyšetření nepodaří zjistit asi u 15 % párů. Při podrobném vyšetření této skupiny převažuje postižení muže. Mužskou neplodností se zabývá několik oborů. Lékařský obor andrologie se zabývá mužským pohlavním zdravím a celkovým zdravotním stavem, který souvisí s funkcemi pohlavních orgánů. Správná funkce varlat, správná tvorba spermií a hormonů jsou jedním z hlavních zájmů andrologie. Na početí nového organismu má správná tvorba spermií v procesu spermatogeneze stejný vliv jako tvorba vajíčka při oogenezi.

Za jednu z dalších příčin neplodnosti je považován zvýšený výskyt a tedy i účinek umělých estrogenů (ženských pohlavních hormonů) v prostředí i v organismu muže. Jde zde také o látky estrogenům jen podobné, syntetické, které ale mohou velmi účinně nepříznivý vliv estrogenů na mužský organizmus napodobovat. Příčin je mnoho (multifaktoriální patogeneze), patří mezi ně také vysoká zátěž cévního systému v současné vyspělé euroamerické oblasti. Problémy s plodností mají proto hlavně lidé z tzv. průmyslově vyspělých zemí (<http://www.androcare.cz/neplodnost.html>). Také kouření cigaret je jedním z faktorů negativně ovlivňujících plodnost mužů. Kouření má vliv převážně na hustotu spermií, kvalitu jejich DNA a morfologii, zejména morfologii hlavičky spermie. Je předpokládáno, že kouření má vliv na morfologii spermie kvůli změnám ve spermatogenezi (Chia, Ong et al. 1994).

Výzkumy spermií se neprovádějí jen u lidí, ale také ve velké míře na myších například při kapacitaci spermií (Fraser 1977), na králících (Paufler and Foote 1968; Suarez, Katz et al. 1983), morčatech (Schwarz and Koehler 1979; Zhong, Xin et al. 1993), psech (Mastromonaco, Hay et al. 2002; Hishinuma and Sekine 2004), ovcích (Blackshaw 1953; Druart, Cognie et al. 2009), netopýrech (Racey 1972), a dokonce i delfínech (Fleming, Yanagimachi et al. 1981; Miller, Styer et al. 2002).

Obzvláště standardní myší modely a modely primátů jsou hodnotným experimentálním organismem k posuzování nových asistenčně reprodukčních technologií (ART) pro lidskou

neplodnost stejně jako podpora programu chovu k zajištění na pomoc přežití ohrožených druhů (Hewitson 2004).

3. Spermatogeneze

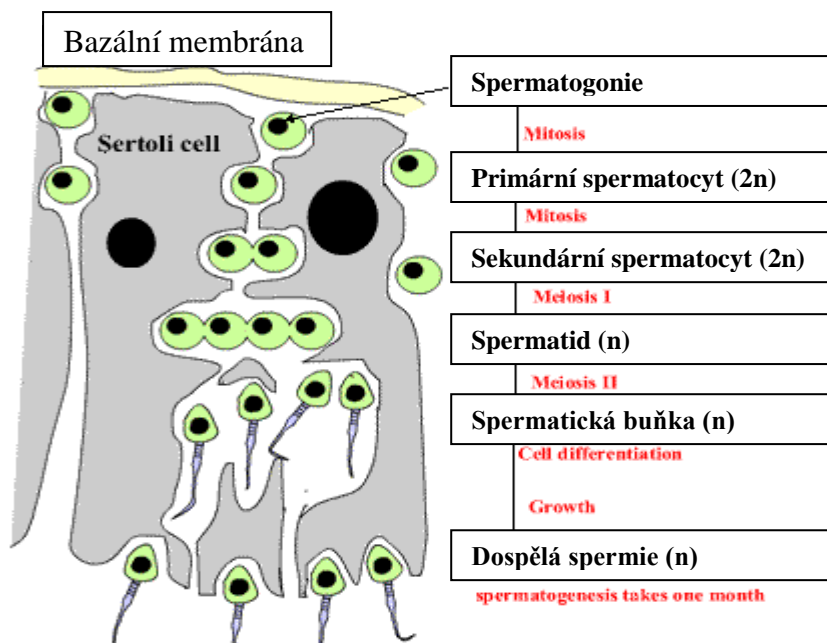
Spermatogeneze je proces vývoje zárodečných buněk k dospělým spermii, který trvá od dospívání po celý zbytek života. Vznik nové spermie u člověka trvá přibližně 65 dní a u myši 34,5 dne a má standardně 3 fáze: rozmnožovací, růstovou a zrání.

Nejprve savčí primordiální zárodečné buňky migrují na pohlavní rýhu samčího embrya a tam se začlení do pohlavní linie. Zde zůstanou až do dospělosti a v té době se pohlavní linie vyhloubí k vytvoření semenotvorných tubulů a epitel tubulů se diferencuje do somatických Sertoliho buněk.

Sertoliho buňky zajišťují a umožňují spermatogenezi, protože vyživují a chrání vyvíjející se spermatické buňky. Sertoliho buňky jsou velmi odolné, ale v období pohlavní dospělosti se již nedělí a jejich obnova není možná. Sertoliho buňky jsou tudíž limitujícím faktorem spermatogeneze.

Iniciace spermatogeneze během puberty je regulovaná syntézou BMP8b (bone morphogenetic protein 8b) spermatogenními zárodečnými buňkami, spermatogoniemi. Když BMP8b dosáhne kritické koncentrace, zárodečné buňky se začnou diferencovat. Diferenciované buňky produkují velké množství BMP8b, které potom může dále stimulovat jejich diferenciaci. Myši postrádající BMP8b neinicují spermatogenezi v pubertě (Zhao et al. 1996).

Spermatogenní zárodečné buňky jsou vázány k Sertoliho buňkám pomocí N-cadherinových molekul (cadherinová molekula v plazmatické membráně jedné buňky se váže k totožné cadherinové molekule v plazmatické membráně sousední buňky) (Alberts 1998) a pomocí galaktosyl- transferázových molekul na spermatogenní buňky. Galaktosyl- transferázové molekuly vážou uhlovodíkový receptor na Sertoliho buňky (Newton et al. 1993; Pratt et al. 1993).



Fáze spermatogeneze

Spermatogonie → mitóza → primární spermatocyt (2n) → sekundární spermatocyt (2n) → meióza I. → spermatid (n) → meióza II. → spermatická buňka → diferenciacie spermií, růst → dospělá spermie (n)

(převzato a upraveno dle <http://click4biology.info/c4b/11/11.4/spermatogenesis2.gif>)

3.1. Rozmnožovací fáze

Po vstupu do seminiferního epitelu varlat se prvotní zárodečné germinální buňky dělí do formy typu A1 spermatogonií (spermatogonie 1. řádu). Tyto buňky jsou menší než prvotní zárodečné buňky a jsou charakteristické vejčitým jádrem, které obsahuje chromatin přidružený k jaderné membráně. Spermatogonie 1. řádu jsou přilehlé k vnější základní membráně pohlavní linie. Jsou to kmenové buňky, které se při dosažení pohlavní dospělosti začínají dělit na další typ A1 a A2 spermatogonií. Tudiž, každé spermatogonium typu A1 je kmenová buňka schopná vlastní regenerace, stejně tak jako produkce nového buněčného typu. Spermatogonie A2 se dělí a dávají vznik spermatogoniím typu A3, které se dělí na spermatogonie typu A4. Předpokládá se, že každé spermatogonium typu A je kmenová buňka schopná sebe obnovení. Spermatogonie typu A4 se diferencují do 3 typů:

Můžou vytvořit další samo obnovující spermatogonium A4, můžou podstoupit buněčnou smrt (apoptózu) nebo se můžou diferencovat ve střední spermatogonium (intermediate spermatogonium).

3.2. Růstová fáze

Střední spermatogonie jsou již determinované buňky vstupující do procesu spermatogeneze a mitoticky se dělí do formy spermatogonií typu B (spermatogonie 2. řádu). Tyto buňky jsou prekurzory spermatocytů a jsou posledními buňkami v řadě, které podstupují mitózu. Jejich dělením vznikají primární spermatocyty – buňky, které vstupují do meiózy.

GDNF neboli neurotrofický faktor pocházející z gliální linie, který je sekretovaný Sertoliho buňkami zprostředkovává přechod mezi spermatogoniemi a spermatocyty. Hladina GDNF určuje, jestli dělicí se spermatogonie zůstanou spermatogoniemi nebo se budou diferencovat ve spermatocyty. Nízká hladina GDNF má za následek diferenciaci spermatogonií, zatímco vysoká hladina vede k jejich setrvání ve formě kmenových buněk (Meng et al. 2000). Protože GDNF je regulovaný folikuly stimulujícím hormonem (FSH), může sloužit jako článek mezi Sertoliho buňkami a endokrinním systémem prostřednictvím FSH, který stimuluje varlata k vyšší produkci spermií (Tadokoro, Yomogita et al. 2002).

Zachováváním kmenových buněk je zajišťována rovnováha. Není snadné produkovat vyvážené množství diferencovaných a nediferencovaných buněk, proto myši, jimž chybí transkripční faktor, který reguluje toto dělení, tzv. luxoid mutace, jsou sterilní. Všechny jejich spermatogonie se diferencují ve spermie najednou, bez zachování kmenových buněk (Costoya, Hobbs et al. 2004).

Každý primární spermatocyt podstupuje první mitotické dělení k vytvoření páru sekundárních spermatocytů, které dokončuje druhé meiotické dělení. Vytvořené haploidní buňky jsou nazývány spermatidy a zůstávají vzájemně spojené pomocí cytoplasmatických můstků a tvoří tzv. syncytium.

Během dělení z typu A1 spermatogonie na spermatidu, se pohlavní buňky pohybují dále a od základní membrány semenotvorných kanálků neboli tubulů do středu lumen. To znamená, že každý typ buňky může být nalezen v určité vrstvě tubulu. Spermatidy jsou umístěny na hranici lumen a tady ztrácejí jejich cytoplasmatické spojení a diferencují se do spermií. U člověka, vývoj spermatogoniální kmenové buňky k dospělé spermii trvá 65 dní (Dym 1994).

Procesy spermatogeneze požadují velmi specializovanou síť genové exprese (Sassone-Corsi 2002). Nejenže histony jsou nahrazeny protaminy specifickými pro spermie, ale ve spermatogenezi se uplatňují i pro spermie specifické transkripční faktory.

3.3. Zrací fáze (diferenciační)

Savčí haploidní spermatida je kulatá, bezbičíkatá buňka, která vzhledem vůbec nepřipomíná dospělou spermii savců, svojí konečnou podobu získává až při diferenciační zrací fázi tzv. spermatelióze.

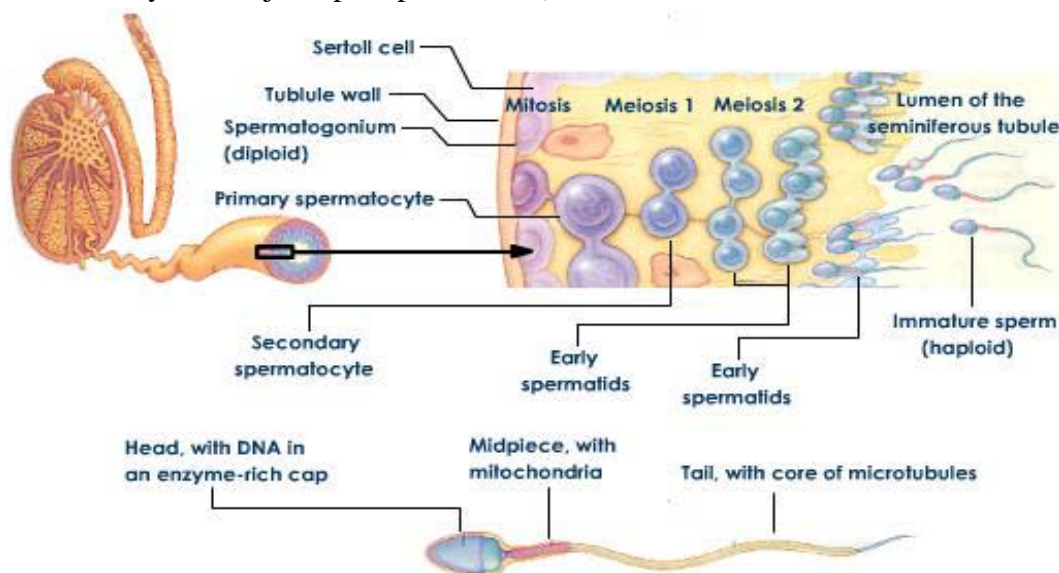
Prvním krokem je tvorba akrozomálního váčku zvětšením Golgiho aparátu. Akrozóm je organela podobná čepičce, která pokryje jádro spermie. Ve váčku je přítomen materiál glykosaminoglykanové povahy a enzymatické proteiny, jako fosfatáza, hyaluronidáza, neuraminidáza a akrozin (jde o proteázu podobající se trypsinu).

(http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_3/data/text/MA_txt6-1-1-2.xml) Jakmile je vytvořen akrozomální váček, jádro se přetočí, takže váček bude čelit základní membráně semenotvorného tubulu. Tato rotace je nezbytná kvůli bičíku, který se začíná tvořit z centrioly na druhé straně od jádra, a bude růst směrem do lumen kanálku. Během poslední fáze spermiogeneze, se jádro zplošťuje a kondenzuje, zbývající cytoplazma je odhozena a mitochondrie tvoří prstenec okolo podstavy bičíku.

Jedna z morfologických změn, která doprovází diferenciaci spermatid je jaderná organizace mužských zárodečných buněk (Fawcett, Anderson et al. 1971; Dooher and Bennett 1973). Během tohoto procesu dochází k různým modifikacím povahy proteinů souvisejících s DNA a výsledkem je postupná kondenzace chromatinu.

Tato morfologická transformace navozuje postupný přesun histonů specifických pro varlata a zbývajících somatických histonů přechodnými bílkoviny 1 a 2 (Tnp1 a Tnp2), u kterých se předpokládá, že se účastní počáteční kondenzace spermatického jádra. Krátce poté jsou přechodné proteiny nahrazeny protaminy, které jsou charakteristické pro jádro dospělé spermie (Balhorn, Weston et al. 1984). Na nahrazení histonů protaminy během spermiogeneze se podílí histon H1FNT, který je nezbytný pro tvorbu jádra ve spermii (Tanaka, Matsuoka et al. 2006).

Toto nahrazení vede ke kompletnímu uzavření transkripce v jádře a umožňuje jádru předpokládanou skoro krystalickou strukturu. Výsledná spermie je posléze kontrakcí posouvána do lumenu semenotvorných tubulů. (Gilbert 2006; <http://www.uwyo.edu/wjm/repro/spermat.htm>).



Průběh spermatogeneze v seminiferním epitelu varlete

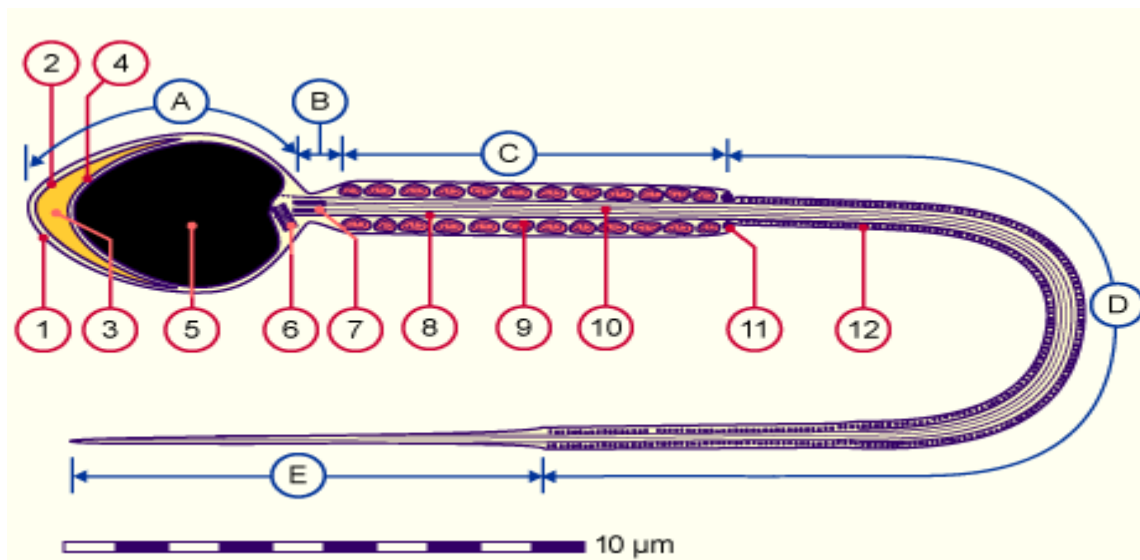
(<http://image.wistatutor.com/content/reproduction-in-animals/spermatogenesis-and-spermiogenesis-stages.jpeg>)

4. Morfologie spermie

4.1. Obecná morfologie savčí spermie

Spermie je specializovaná pohlavní buňka a liší se od ostatních tělesných buněk. Celková délka spermie se u savců liší od 125 μm u myši po přibližně 60 μm u člověka (Chatterjee 2003).

Spermie se skládá z hlavičky, krčku (spojovací část) a bičíku. Bičík má tři části: střední, hlavní a koncovou část.



Stavba a hlavní komponenty spermie

- 1 Plazmatická membrána
- 2 Vnější akrozomální membrána
- 3 Akrozóm
- 4 Vnitřní akrozomální membrána
- 5 Jádro
- 6 Proximální centriola
- 7 Zbytek distální centrioly
- 8 Vnější fibrózní vlákna
- 9 Mitochondrie
- 10 Axonema
- 11 Terminální disk (anulus)
- 12 Prstencová vlákna (ring fibers)

- A Hlavička
B Krček
C Střední část
D Hlavní část
E Koncová část

(upraveno dle:

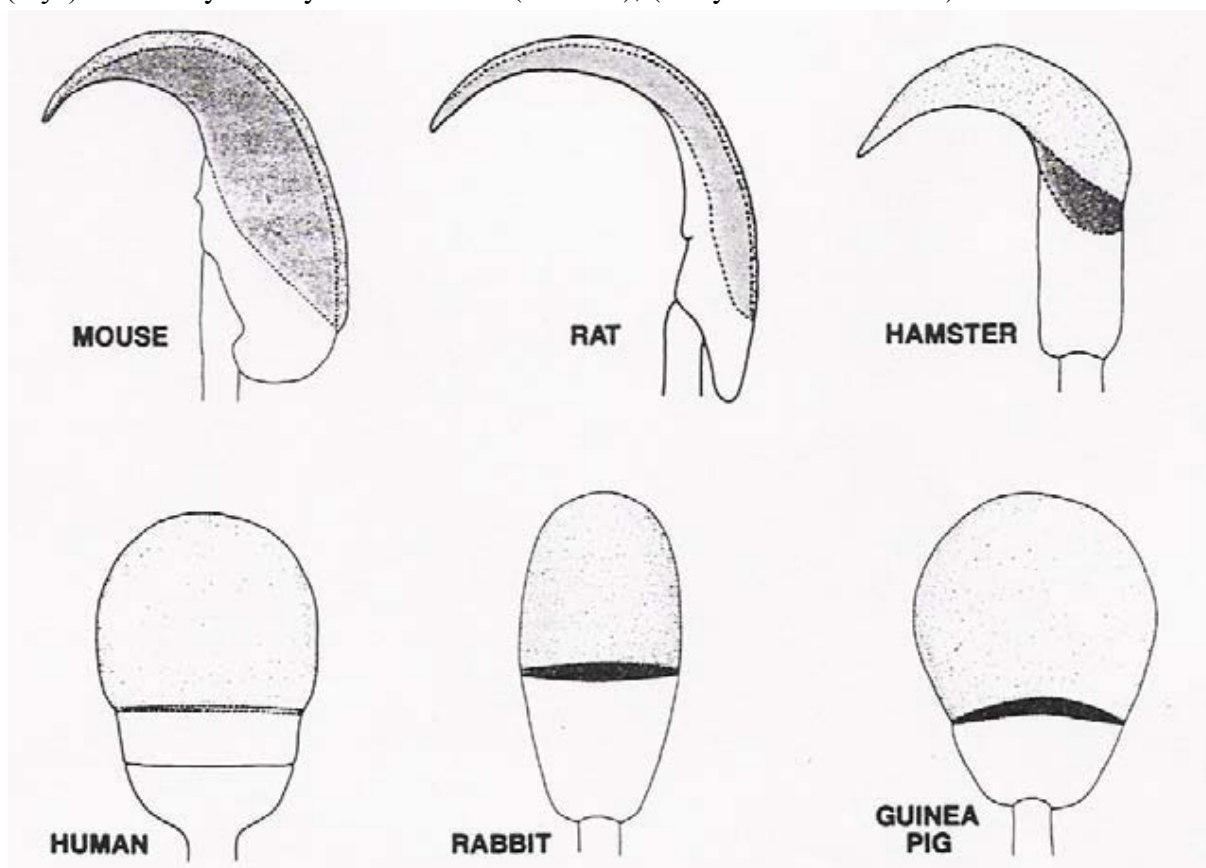
www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato05.html#spermiohistogenese)

4.1.1. Hlavička spermie

Hlavička spermie u člověka je anteriorně zúžená talířovitá struktura vejcovitého tvaru. Tloušťka hlavičky spermie postupně vzrůstá směrem k základně, takže se zdá oválná, když je pozorována zepředu, ale zdá se být špičatá jako špička, když je pozorována ze strany.

Tvar hlavičky spermie se u jednotlivých druhů savců liší. Rozlišujeme čtyři základní morfologické typy hlaviček: kulaté (člověk), oválné (kanec), háčkovité neboli falciformní

(myš) a hlavičky s velkým akrozómem (veverka), (Eddy & O'Brien 1994).



Morfologické typy hlavičky spermie. (Eddy & O'Brien 1994)

Tvar hlavičky je určen převážně jádrem. Jádro a akrozóm zaujímají většinu prostoru hlavičky a jsou obklopeny malým množstvím cytoplazmy a cytoskeletálních částic. Hlavička lidské spermie obsahuje oválné jádro, které je mírně zúžené směrem k vrcholu a má mělký výklenek u základny nazývaný implantační jamka. Jádro je obklopeno jadernou membránou. Akrozóm se nachází v anteriorní části hlavičky spermie. Je dvouvrstvý a jeho vnitřní membrána pokrývá anteriorně asi 30 až 70% vnější membrány jádra. Vnější akrozomální membrána leží těsně pod plazmatickou membránou anteriorní části hlavičky. Mezi vnitřní a vnější akrozomální membránou leží akrozomální váček s lytickými enzymy. Vzniká zvětšením Golgiho aparátu během spermateliózy a obsahuje hydrolytické enzymy nezbytné pro penetraci spermie skrz obaly obklopující vajíčko (Hightower, Boockfor et al. 1999). Cytoskeletální struktury hlavičky tvoří subakrozomální, postakrozomální a para-akrozomální cytoskelet, který plní strukturální úlohu při tvarování hlavičky (Clermont, Einberg et al. 1955) a funkční úlohu při penetraci do vajíčka (Olson, Noland et al. 1983).

Charakteristiky jádra

1. Jádro obsahuje extrémně kondenzovaný chromatin, a proto vypadá, že je homogenní konsistence, i když je pozorováno elektronovým mikroskopem. (Gray's Anatomy 1996). Defekty v kondenzaci jaderného materiálu jsou často viditelné pod světelným mikroskopem jako relativně jasné oblasti nebo jaderné vakuoly. Extrémní kondenzace

jaderného chromatinu vytváří hlavičku spermie výrazně odolnější k různým fyzickým zátěžím. Další důležité charakteristiky jádra jsou následující (Chatterjee 2003):

2. Jádro obsahuje 40% DNA.
3. Je bohaté na Arginin. Arginin je jedna ze základních aminokyselin a má vliv na správné fungování spermatogeneze, protože je základní složkou protaminů (proteinů, které nahrazují histony během finální fáze spermateliózy). (Vilfan, Conwell et al. 2004).
4. Má silnou slučivost se základními barvami.
5. Absorbuje ultra fialové paprsky.
6. Je odolné proti deoxyribonukleáze.

4.1.2. Krček – spojovací část

Krček je také nazýván spojující částí, protože zajišťuje spojení mezi hlavičkou a bičíkem spermie. V krčku se nacházejí dvě hlavní struktury – základní tělo, které je tvořené kapitulem a segmentovanými provazci, a centriola. Krček je proximálně připojený ke kapitulu a distálně ke střední části bičíku. Kapitulum je vláknitá struktura, která zapadá do implantační jamky u základny jádra. Implantační jamka je tvořena posteriorní částí jaderného obalu a bazální destičkou. V této části se nacházejí axiální vlákna, která spojují bazální destičku hlavičky s kapitulem a v tomto místě dochází k oddělení hlavičky od bičíku při vědeckých experimentech (Pedersen 1972). Z posteriorní části kapitula se táhne devět segmentovaných provazců. Centriola leží pod implantační jamkou a hraje velmi důležitou roli při oplodnění a rýhování embrya, protože ovlivňuje jeho vývoj (Sathananthan, Ratnam et al. 1996). Axonema se táhne těsně za centriolou a prochází dále do bičíku, kde na spojení střední a hlavní části prochází skrz prstencovou strukturu nazývanou se anulus.

4.1.3. Bičík spermie

Bičík poskytuje spermii hnací sílu potřebnou k oplození vajíčka. Skládá se ze střední, hlavní a koncové části a jeho průměr se posteriorním směrem zužuje. Hlavními strukturami bičíku jsou axonema, mitochondriální pochva, fibrózní pochva a vnější hustá vlákna.

Střední část

Je to dlouhá válcovitá struktura sestávající z centrální axonemy obklopená mitochondriální pochvou a obalená buněčnou membránou. Mitochondrie spermatid jsou přemístěné do mitochondriální pochvy a jsou seskupené spirálovitým způsobem. Člověk má dvanáct otáček mitochondriálních spirál. U myši se mitochondrie obtáčí v levotočivé dvou-spirálovité struktuře, která má až 87 spirál (Woolley 1970) a je formována ve 4 fázích během spermatogeneze (Ho and Wey 2007). Mitochondriální pochva zajišťuje spermii energii pro pohyb. Spermie se aktivně pohybuje proti proudu a je chemicky přitahována k vajíčku (pozitivní chemotaxe). Pohon pro spermii je zajišťován hydrolýzou molekul ATP, které

vznikají činností mitochondriální pochvy a tzv. molekulárního motoru - proteinu dynein (Karp 2005).

Axonema, neboli osní vlákno bičíku spermie, je svazek mikrotubulů (Stenesh 1989) obvykle se skládající z jednoho centrálního páru mikrotubulů a devíti dalších párů uspořádaných v kruhu kolem něho ($9 \times 2 + 2$). Axonema funguje primárně jako organizační centrum pohybu bičíku (Porter and Sale 2000) a axonema bičíku spermie má stejné uspořádání jako většina bičíků a řasinek eukaryotických buněk.

Fibrózní pochva se nachází přímo pod plazmatickou membránou po celé délce hlavní části bičíku. Uvnitř fibrózní pochvy je vrstva devíti vnějších hustých vláken. Tyto vlákna jsou ve tvaru okvětího plátku a nepravidelné velikosti. Slouží jako výztuha a zajišťují bičíku jeho elastické schopnosti. Jsou přítomné ve střední a hlavní části, ale chybí v koncové části. Každé z devíti vláken se spojuje s jedním odpovídajícím párem mikrotubulů axonemy. Střed axonemy skládající se z centrálního páru mikrotubulů je přítomný uvnitř devíti párů mikrotubulů. Z vnějších hustých vláken vedou paprscité linie do centrálního páru mikrotubulů.

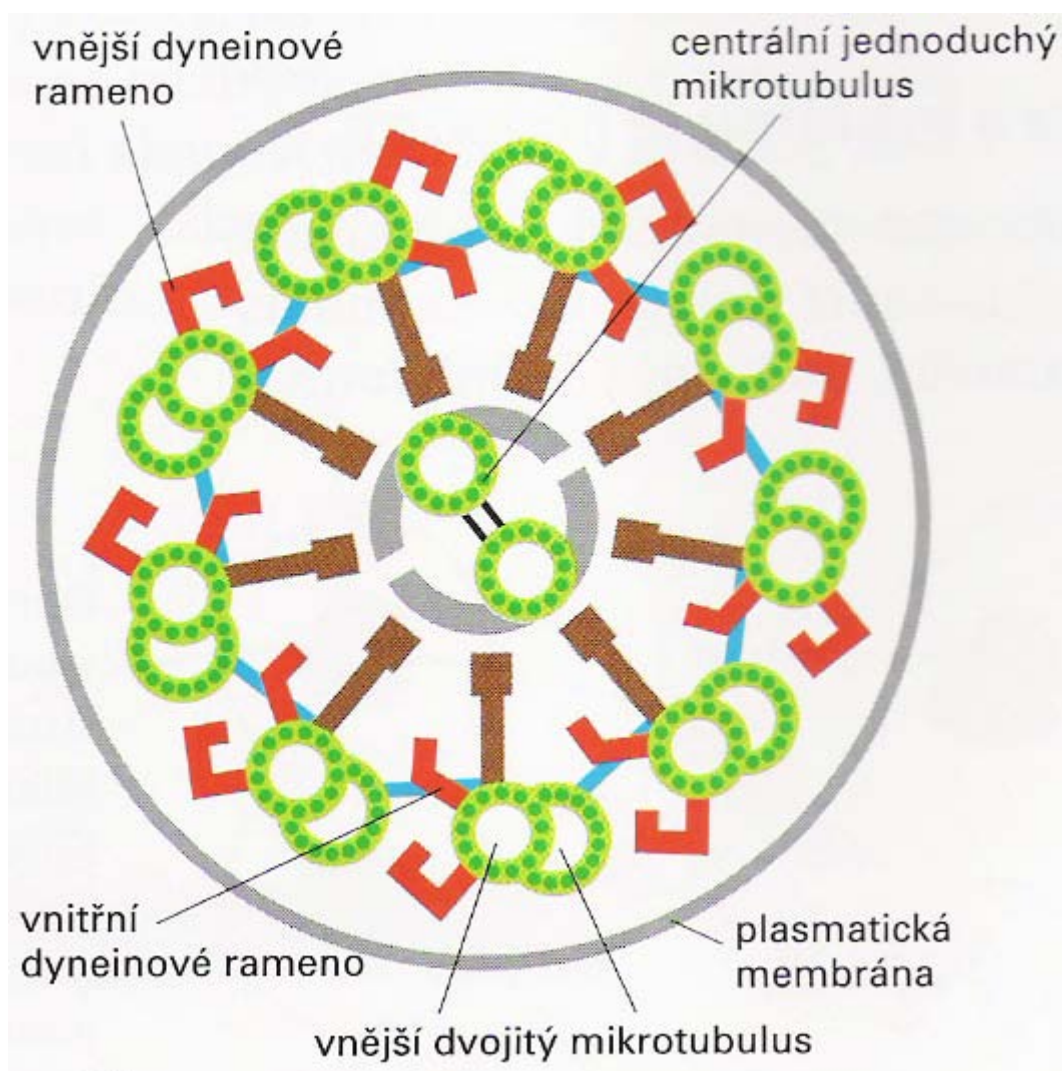
Hlavní část

Struktura hlavní části bičíku je podobná struktuře střední části, ale neobsahuje mitochondriální pochvu. Devět vnějších hustých vláken střední části se postupně zeslabuje a nakonec zmizí zanechávající pouze vnější vlákna axonemy po zbytek délky hlavní části.

Jak bylo zmíněno výše, uvnitř vrstvy fibrózní pochvy je devět vnějších hustých vláken s čísly určenými od 1 do 9 po směru hodinových ručiček. Přímka spojující vlákna 3 a 8 dělí bičík do většinového prostoru obsahujícího 4 vlákna a menšinového prostoru s 3 vlákny. Tato přímka také prochází skrz oba centrální mikrotubuly a poskytuje osu, ze které mohou být analyzované pohyby spermie. (Inderbir Singh and Pal 2003).

Koncová část

Koncová část se skládá z centrálního páru mikrotubulů obklopeného plazmatickou membránou (Phadke 2008).



Průřez bičíkem spermie
(Alberts 1998)

4.1.4. Plazmatická membrána

Plazmatická membrána je velmi důležitou součástí spermatické buňky a obklopuje hlavičku, krček a bičík spermie. Úlohou membrány je ochrana buněčného obsahu a hraje důležitou roli při kapacitaci spermie a při interakci spermie a oocyty. Struktura membrány a její následná reorganizace v průběhu kapacitace je důležitá pro schopnost oplození spermie. Struktura plazmatické membrány je tvořena jednou dvouvrstvou fosfolipidů, v ní ukotvených bílkovin a na povrchu glykokalyxem (vrstva molekul rozvětvených glykoproteinů).

4.2. Definice normální lidské spermie dle norem WHO

Kvalita semene je považována za důležité ohodnocení mužské plodnosti v klinické andrologii, reprodukční toxikologii, epidemiologii a při posuzování rizik těhotenství. Referenční intervaly pro hodnoty parametrů semene z plodné populace poskytují údaje, z nichž lze odvodit plodnost nebo neplodnost. Tyto údaje představují řádné referenční rozdělení vlastností

spermatu fertilních mužů v řadě zemí. Poskytují vhodný nástroj v kombinaci s klinickými daty k ohodnocení kvality spermatu pacienta a perspektivy plodnosti (Cooper, Noonan et al. 2010).

Lidské spermie patří ke skupině spermií těch živočišných druhů, u kterých je zaznamenána heterogenita spermií v semeni. Tato situace je rozdílná od většiny druhů, například hlodavců, některých primátů aj., u kterých je tvar a struktura spermií uniformní (Phadke 2008).

Světová zdravotnická organizace (WHO - World Health Organization) stanovila kritéria pro určení stavu spermií v laboratorním manuálu WHO (WHO 1992, 1999, 2010).

Objem a vzhled ejakulátu

Spodní referenční mez pro objem ejakulátu je 1,5 ml a sperma by mělo mít homogenní, šedavě opalescentní vzhled.

PH

V současné době existuje několik referenčních hodnot pro pH spermatu plodných mužů, ale všeobecně by se mělo pohybovat v rozmezí od 7,2 po 8,0.

Pohyblivost spermií (motilita)

Rozsah progresivní pohyblivosti spermií souvisí s podíly úspěšnosti otěhotnění (Jouannet, Ducot et al. 1988) Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000).

Jednoduchý systém třídění pohyblivosti spermií rozlišuje 3 kategorie: progresivní (rychlá) pohyblivost (PR), spermie se pohybují aktivně a to buď lineárně, nebo ve velkých kruzích nezávisle na rychlosti. Neprogresivní (pomalá) pohyblivost (NP) zahrnuje všechny ostatní modely hybnosti s absencí progresu, např. plavání v malých kruzích, kdy se bičík stěží snaží přemísťovat hlavičku spermie. Poslední kategorií je nepohyblivost (IM), při níž spermie nevykazuje žádný pohyb. Spodní referenční mez pro celkovou pohyblivost (PR + NP) je 40% a spodní referenční mez pro progresivní pohyblivost (PR) je 32%.

Životnost spermií (vitalita)

Životaschopnost spermií je důležitá zejména pro vzorky s méně než 40% progresivně pohyblivých spermií. Tento test může poskytnout kontrolu hodnocení pohyblivosti spermií, protože procento mrtvých buněk by nemělo přesáhnout procentuální podíl nepohyblivých spermií. Procento životaschopných buněk je obvykle vyšší než procento pohyblivých buněk. Procento živých spermií se posuzuje označením spermií s neporušenou buněčnou membránou. Přítomnost velkého množství životaschopných, ale nepohyblivých spermií může svědčit o strukturálních vadách bičíku (Chemes and Rawe 2003). Vysoké procento nepohyblivých a neživých spermatických buněk (nekrozoospermie) může ukazovat na epididymální (umístěné v nadvarleti) patologie (Wilton, Temple-Smith et al. 1988; Correa-Perez, Fernandez-Pelegrina et al. 2004). Spodní referenční mez pro životaschopnost (spermie s neporušenou membránou) je 58%.

Počet spermií

Celkový počet spermií na ejakulát a koncentrace spermií se oboje vztahují k TTP (TTP = time to pregnancy = počet menstruačních cyklů před úspěšným otěhotněním *in vivo* – je používáno jako parametr schopnosti dosáhnoutí oplodnění) (Slama, Eustache et al. 2002) a k podílům úspěšnosti otěhotnění (Zinaman, Brown et al. 2000) a jsou předpovídanými ukazateli počtů (Bonde, Ernst et al. 1998; Larsen, Scheike et al. 2000). Termíny celkový počet spermií a koncentrace spermií nejsou synonymní. Koncentrace spermií je počet spermií na jednotku objemu spermatu a celkový počet spermií je celkový počet spermií v celém ejakulátu. Spodní referenční hranice pro koncentraci spermií je 15×10^6 spermií / ml a spodní referenční mez pro celkový počet spermií je 39×10^6 spermií na ejakulát.

Morfologie spermií

Spodní referenční limit byl roku 2010 nově stanoven WHO na alespoň 4% normálních forem spermií. Podle WHO 1999 bylo požadováno minimálně 15% spermií s normálním tvarem. Za normální tvar je považován klasický oválný tvar hlavičky, přičemž 40–70% oblasti hlavičky pokrývá akrozóm. Střední část pravidelná a zhruba stejně dlouhá jako hlavička a bičík asi 10 krát delší bez výrazného úhlového zahnutí.

4.3. Klasifikace patologické spermie dle norem WHO

Vzorky lidského spermatu obsahují různé druhy postižení. Zvýšené procento spermií s abnormálními tvary je obvykle způsobeno defektní spermatogenezí a některými epididymálními patologiemi. Morfologické vady jsou obvykle smíšené. Abnormální spermie mají obecně nižší potenciál oplodnění v závislosti na typu anomálie a mohou mít také abnormální DNA. Morfologické defekty bývají spojovány se zvýšenou fragmentací DNA (Gandini, Lombardo et al. 2000), se zvýšeným výskytem strukturálních chromozomových aberací (Lee, Kamiguchi et al. 1996), s nezralým chromatinem (Dadoune, Mayaux et al. 1988) a aneuploidií (genomová mutace) (Devillard, Metzler-Guillemain et al. 2002; Martin, Rademaker et al. 2003). Důraz je dáván především na formu hlavičky, i když bičík spermie (střední a hlavní část) je také brán v úvahu.

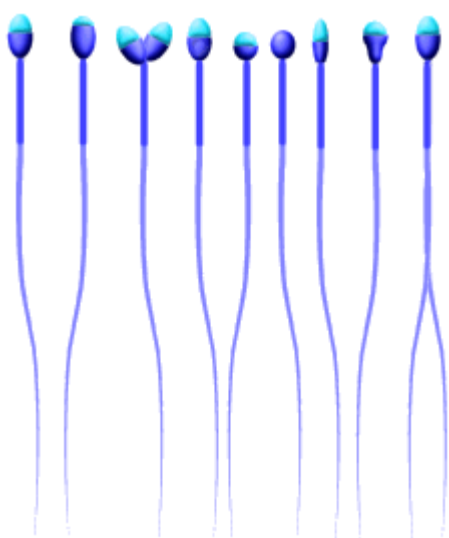
Kategorie defektů jsou následující:

Defekty hlavičky: velká nebo malá hlavička, kónická, hruškovitá, kulatá, amorfní, s vakuolami (více než dvě vakuoly nebo více než 20% oblasti hlavičky obsazené vakuolami), vakuoly v post-akrozomální oblasti, malé nebo velké plochy akrozómu (méně než 40% nebo více než 70% plochy hlavičky), dvojité hlavičky, nebo jakákoli kombinace těchto vad.

Vady krčku a střední části: asymetrické spojení střední části s hlavičkou, silná nebo nepravidelná střední část, ostře zahnutá, abnormálně tenká, nebo jakákoli kombinace těchto vad.

Vady hlavní části bičíku: krátká, několikanásobná, zlomená, ostré úhlové zahnutí, nepravidelná tloušťka, stočení nebo jakákoliv kombinace těchto vad.

Nadměrná zbytková cytoplazma (ERC - Excess residual cytoplasm): souvisí s abnormálními spermii pocházejícími z defektní spermatogeneze. Spermie charakterizovány velkým množstvím cytoplazmy, ze třetiny nebo více velikosti hlavičky spermie, často spojené s defektní střední částí jsou abnormální (Mortimer and Menkveld 2001). Tento abnormální přebytek cytoplazmy u ejakulovaných spermií je nazýván reziduální cytoplazmatická kapka, nicméně cytoplazmatické kapky jsou často normálními součástmi fyziologicky funkčních lidských spermií (Cooper, Yeung et al. 2004).



Abnormality u spermií

Zleva doprava: spermie normálního tvaru, spermie s malým akrozómem, se dvěma hlavičkami, s vakuolou v hlavičce, s kulatou hlavičkou, s kulatou hlavičkou bez akrozómu, se zúženou hlavičkou, hruškovitou hlavičkou a se dvěma bičíky. (<http://www.repromeda.cz>).

4.4. Patologie vedoucí k asistované reprodukci

4.4.1. Nedostatečný počet spermií v ejakulátu - oligospermie

Oligospermie je definována jako množství spermií v samčím ejakulátu nižší než 15 milionů spermií na 1ml ejakulátu (podle WHO 2010), nebo také jako snížená tvorba spermií (www.oligospermia.com). U normálního zdravého spermatu je počet spermií kolem 60 milionů na 1 ml ejakulátu (<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/iju/vol2n1/sperm.xml>).

Oligospermie je jedna z nejběžnějších příčin samčí neplodnosti. Její výskyt je snadno identifikovatelný pomocí vyšetření spermioqramu. Často však semeno se sníženou koncentrací může také poukazovat na významné abnormality v morfologii spermií a jejich pohyblivosti (oligoasthenoteratozoospermie). Ukázalo se, že je namístě nahradit popisné termíny používané v analýze spermií raději kvantitativními informacemi (Grimes and Lopez 2007).

Diagnostika oligospermie je založena na 2 měřeních analýzy spermatu s jedním nízkým výsledkem. Po několik desetiletí byla koncentrace spermií nižší než 20 milionů spermií na ml považována za nízkou nebo oligospermickou. Nicméně, WHO roku znovu přehodnotilo kritéria normální spermie a stanovilo nižší referenční bod: méně než 15 milionů spermií na 1 ml, což odpovídá 5 procentům pro plodné samce (Cooper, Noonan et al. 2010). Avšak koncentrace spermií kolísá a oligospermie může být dočasná nebo trvalá.

Faktory přispívající nebo způsobující oligospermii mohou být vrozené nebo získané a jsou velmi podobné jako u azospermie - nepřítomností zralých spermií v ejakulátu.

Vrozené faktory: Urologické a endokrinní poruchy: varikokéla (rozšíření žil v oblasti šourku) a chronické infekce močových cest. Endokrinní poruchy, jako je deficit gonadotropinu, cushingův syndrom (endokrinní porucha způsobená vysokou hladinou kortizolu v krvi), hyperprolaktinémie (zvýšená hladina hormonu prolaktinu v krvi), hemochromatóza (nadměrným vstřebáváním železa z trávicího traktu a jeho následným ukládáním v orgánech), panhypopituitarismus (celková nedostatečnost hypofýzy provázená nedostatkem jejích hormonů), vady strukturální a rozvojové, Klinefelterův syndrom, de la Chapellův syndrom (XX male syndrom), izolovaný deficit FSH, vrozená adrenální hyperplazie (onemocnění kůry nadledvin), administrace estrogenu, germinální aplazie, kryptorchismus (porucha sestupu jednoho nebo obou varlat do šourku).

Získané faktory:

- 1) Přehřívání, práce v zónách s vysokou teplotou
- 2) Špatná výživa a nedostatek vitaminů: vitamin C, selen, zinek a kyselina listová
- 3) Chemoterapie, obezita, kouření, pití alkoholu.
- 4) Expozice těžkým kovům a dalším faktorům životního prostředí.
- 5) Psychologické faktory: Duševní stres, úzkost a deprese.
- 6) Environmentální faktory: kontaminace pitné vody a potravy reziduálními antibiotiky, hormonálními aditivy a toxickými příměsemi způsobuje nízký počet spermií a jejich sníženou pohyblivost.
(http://www.oligospermia.com/treatment/Low_Sperm_Count.htm).

Průzkum uskutečněný roku 1976 ukazuje, že 53,1% neplodných mužů ze vzorku je postiženo oligozoospermii (Aafjes and van der Vijver 1976). U pouhé menšiny těchto mužů byl zjištěn specifický problém, například kryptorchismus, varikokéla nebo infekce. Ve většině případů byla zjištěna i abnormální morfologie spermií a/nebo nízká pohyblivost (Freund 1962).

U pacientů s nízkým průměrným skórem biopsie bylo zjištěno, že mají nízkou pravděpodobnost oplodnění kvůli těžce defektní nebo nefunkční spermatogenezi ve tkáních varlete. Pacienti s vyšším průměrným skóre byli daleko častěji plodní důsledkem rovnoměrnějšího rozdělení lehce defektní spermatogeneze, přestože stupeň oligospermie, souzeno podle počtu spermií, pohyblivosti a morfologie, byl srovnatelný. Hormonální údaje těchto pacientů s různým skórem biopsie byly také podobné (Aafjes, van der Vijver et al. 1977).

Příčinám a důsledkům oligospermie je proto velice špatně porozuměno. Pro lepší pochopení této nemoci bude užitečné předvést živočišný model.

Plodnost u kryš s uměle navozenou oligospermii:

Těžká oligospermie a azospermie může být navozena jak ozářením, tak jedním malým varletem a při srovnání výsledků získaných z ozářených kryš s těmi získaných z jedinců s jedním malým varletem se ukázal zajímavý rozdíl (Aafjes, Vels et al. 1980). Krysy s epididymálními spermie z jednoho malého varlete byly plodné a ozářené krysy s navozenou „flekátou“ spermatogenezí nebyly oplození schopné, což podpořilo hypotézu (Aafjes, van der Vijver et al. 1978), že „flekátá“ spermatogeneze negativně ovlivňuje normální zrání nebo transportní procesy nebo oboje v tubulech, což vede k defektním spermii s nízkým potenciálem oplodnění.

Další výzkum na myši jako modelovém organismu ukázal, že ztráta androgenního receptor (AR) v peritubulárních myoidních buňkách varlete - buňky obklopující seminiferní kanálky ve varleti (Maekawa, Kamimura et al. 1996), vede k 57% redukci epididymálních (pocházejících z nadvarlat) spermii, ale normální plodnosti (Zhang, Yeh et al. 2006). Toto zjištění není překvapující, neboť bylo zaznamenáno, že dopad na plodnost by měl mít podle odhadů počet spermii snížený až na 10% nebo méně (Santi, Mikkonen et al. 2005).

Genetické mutace vysvětlují oligozoospermii jen u zlomku pacientů a proto je podezření, že epigenetické účinky by mohly také hrát roli jako příčina oligozoospermie (Gianotten, Lombardi et al. 2004). Tyto studie (Marques, Carvalho et al. 2004; Kobayashi, Sato et al. 2007; Marques, Costa et al. 2008) ukázaly, že ve spermii oligozoospermických mužů probíhá abnormální metylace DNA v regulačních oblastech, které kontrolují imprintovanou genovou expresi a které jsou známy jako kontrolní oblasti imprintingu (ICRs). Tento pozoruhodný náález naznačuje, že vady v spermatogeneze mohou být spojeny s epigenetickými regulace imprintingu v samčí zárodečné linii. Tím se vzbuzují obavy, zda abnormální otisky v samčích zárodečných buňkách mohou mít zdravotní důsledky pro příští generace (Filipponi and Feil 2009).

4.4.2. Nepřítomnost spermií v ejakulátu - azoospermie

Azoospermie je definována jako nepřítomnost zralých spermií v centrifugovaném vzorku spermatu, zatímco aspermie je sexuální dysfunkce typu anejakulace nebo retrográdní ejakulace a má za následek nepřítomnost ejakulátu. (Zvěřina 2003). Při retrográdní ejakulaci se spermie nevyučují ven močovou trubicí, ale močovou trubicí směrem do močového měchýře. Laboratorně se tedy dají živé spermie získat z moče (<http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>).

Případy azoospermie jsou rozlišovány na obstrukční a neobstrukční.

Obstrukční azoospermie (OA) je většinou způsobena neprůchodností semenných cest či přerušením komunikace mezi varletem a uretrou (močovou trubicí), což zabraňuje spermiím vstupovat do spermatu. Obstrukční azoospermie je dokázána provedením testikulární biopsie, při níž se prokáže, zdali probíhá spermatogeneze.

Neobstrukční azoospermie (NOA) je způsobena výrazně sníženou produkcí spermií, která vede k nepřítomnosti spermií ve spermatu. Obvykle se jedná o těžké poškození tvorby spermií v seminiferních kanálcích varlat. Vývojové poruchy germinálního epitelu spočívají buď v jeho agenezi (vrozené ztráta nebo nevyvinutí orgánu nebo jeho části) jako například u Sertoli-cells-only syndromu (SCO - nepřítomnosti semenotvorných kanálků v germinálním epitelu varlate, zatímco Sertoliho buňky jsou přítomny) (<http://emedicine.medscape.com/article/437884-overview>), nebo v zástavě zrání na úrovni spermatogonií, spermatocytů či spermatid (Kolářová, Vrtel et al. 2003). Porucha germinálního epitelu může mít genetický základ, spočívající zejména v poruše na dlouhém raménku chromozomu Y (azoospermický faktor AZF) (O'Flynn O'Brien, Varghese et al. 2010).

Toto rozlišení na obstrukční a neobstrukční azoospermii je důležité i při aspiraci spermií (pomocí MESA/TESA/PESA) a využití intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) a to ze dvou důvodů: za prvé, úspěšná aspirace spermií je daleko více pravděpodobná u obstrukční azoospermie. Za druhé, potenciální genetické vady jsou rozdílné u těchto dvou typů azoospermie (Kolettis 2002). Výskyt azoospermie u neplodných mužů je mezi 5% a 20%, zatímco v běžné populaci je to okolo 2% (Jarow, Espeland et al. 1989; Jarow 1994).

Příčiny azoospermie:

Genetické příčiny: Abnormální karyotyp byl nalezen u 13,7% azoospermických mužů (Van Assche, Bonduelle et al. 1996). Pokud jsou nalezeny karyotypické abnormality, je vyžadováno vhodné genetické poradenství, protože jsou zde potenciální genetické důsledky pro potomky (Rucker, Mielnik et al. 1998). Jednou z genetických příčin azoospermie je například geneticky přenosná nemoc cystická fibróza, geneticky podmíněný hypogonadismus, jakým je například XX-male syndrom nebo Klinefelterův syndrom (Ceylan, Ceylan et al. 2010) (poruchy pohlavních chromozomů; XX-male syndrom je způsoben vadou při crossing-overu v průběhu meiózy, kdy jeden nebo oba chromozomy X obdrží SRY- pohlaví

determinující faktor Y; jedinec s Klinefelterův syndrom má 2 chromozomy X a jeden chromozom Y). Tkáň varlete může být postižena zánětem (orchitida, epididymoorchitida), úrazem, nebo torzí varlat. Také poškozením cytostatickou terapií a/nebo radiací.

4.4.3. Nepohyblivost spermií - asthenozoospermie

Asthenozoospermie (neboli asthenospermie) je termín pro sníženou pohyblivost spermií. Je to jedna z hlavních příčin neplodnosti nebo snížené plodnosti mužů. Asthenospermie je definována výskytem méně než 40 % pohyblivých spermatických buněk v odebraném vzorku (WHO 2010). Starší publikace uvádějí 50% motilitu (Rolf, Cooper et al. 1999).

Asthenospermie je v některých případech je spojována s významnými morfologickými abnormalitami bičíku. Nesprávná konstrukce axonemy (Mitchell, Rives et al. 2006; Moretti, Pascarelli et al. 2008) nebo dalších struktur bičíku, zejména fibrózní pochvy (Escalier 2003) může způsobit abnormální pohyblivost spermií a v některých případech závažnou asthenospermii (Escalier 2006; Escalier and Albert 2006). Bylo navrhováno, že genetický základ je příčinou abnormalit bičíku u lidských spermií (Chemes 2000; Baccetti, Capitani et al. 2001; Chemes and Rawe 2003), ale sekvence a exprese anomálií byla popsána jen pro několik málo genů kódujících strukturální proteiny, které tvoří bičík (Baccetti, Capitani et al. 2002; Peknicova, Pexidrova et al. 2007; Zuccarello, Ferlin et al. 2008). Efektivním způsobem identifikace genů nezbytných pro důležité fyziologické procesy je výzkum zaměřený na myší geny; více než 300 myších modelů poskytlo informace o genech potřebných pro mužskou plodnost (Grootegoed, Baarends et al. 1998; Okabe, Ikawa et al. 1998; Escalier 2001; Matzuk and Lamb 2002; Escalier 2006; Escalier 2006; Escalier 2006; Roy and Matzuk 2006). Nedávno bylo také na myším modelu prokázáno, že absence prstencové struktury nazývané anulus, která se v normálním případě nachází na spojení střední, a hlavní části spermie, je jednou z potenciálních příčin snížené pohyblivosti spermií. U myši nepřítomnost této části vede k vážné asthenospermii a neplodnosti, kdežto u člověka se předpokládá, že dopad na plodnost není tak závažný (Lhuillier, Rode et al. 2009).

4.4.4. Patologická morfologie spermií - teratozoospermie

Teratozoospermie neboli teratospermie, je termín pro abnormálně tvarovanou spermii, také známý jako špatná morfologie spermií. O teratozoospermii se jedná při snížené hladině spermií normálního tvaru (méně než 15 % spermií normálního tvaru) (Machev, Gosset et al. 2005). Rozlišujeme 2 typy teratospermie: lehká teratospermie – 10–15 % spermií normální morfologie – pravděpodobně s omezeným klinickým významem a těžká teratospermie – méně než 4% spermií normálního tvaru (WHO 2010).

Příčiny a faktory teratospermie mohou být různé a jsou velmi podobné faktorům zmiňovaným u oligospermie. Často jsou neobjevené. Genetický faktor je velmi častou příčinou teratospermie.

V jedné studii byla navozena mutace přechodného proteinu Tnp2 (protein aktivní u náhrady histonů za protaminy ve spermiogenezi) u myši a hlavička spermie u takovéto myši se stala vážně deformovanou společně s deformací akrozómu. Tyto výsledky ukazují, že neplodnost mužů s nedostatkem proteinu Tpn2 je nejpravděpodobněji způsoben abnormální morfologií hlavičky (Adham, Nayernia et al. 2001).

Jeden ze vzácných případů abnormální morfologie spermie jsou spermie s kulatou hlavičkou-globozoospermie. Identifikace mužského pacienta trpícího globozoospermii je relativně vzácný případ, protože výskyt globozoospermie u neplodných mužů je méně než 0,05%. Kvůli nepřítomnosti akrozomálních struktur a obsahů, spermie s kulatou hlavičkou byly popsány, že mají radikálně sníženou schopnost vázat se k zona pellucida a proniknou do oocyty. Také se ukázalo, že tyto spermie mají nedostatečný oocyt-aktivující faktor a mohou mít chromozomální vady (Rybouchkin, Dozortsev et al. 1996; Edirisinghe, Murch et al. 1998; Vicari, Perdichizzi et al. 2002).

4.4.5. Další formy patologií

Oligoasthenozoospermie

Kombinace oligozoospermie a asthenozoospermie. Jedná se o kategorii s redukovanou koncentrací spermií ($<15 \times 10^6$ spermií/ml) a se sníženou pohyblivostí, vzhledem k normám WHO (WHO 2010).

Oligoasthenoteratozoospermie

Jedná se o kombinaci oligozoospermie, asthenozoospermie a teratozoospermie. Tento stav provází snížená koncentrace spermií ($<15 \times 10^6$ spermií/ml), menší pohyblivost spermií a snížený podíl spermií normálního tvaru (<4 % spermií normálního tvaru).

5. Klasifikace a hodnocení morfologie lidských spermií a jejich využití v metodách asistované reprodukce

5.1. Intrauterinní administrace spermií – IUI

Intrauterinní inseminace (IUI) patří k nejstarším a nejvíce využívaným metodám asistované reprodukce, avšak nebyla ještě klasifikována jako jedna z asistenčně reprodukčních technologií (ART) (Zegers-Hochschild, Nygren et al. 2006). IUI je jednodušší léčba než ART jako například IVF nebo ICSI a je také daleko levnější (http://infertility.about.com/od/infertilitytreatments/a/what_is_IUI.htm).

Tato metoda, také známá jako umělá inseminace je proces přípravy a doručení vysoce koncentrovaného počtu v ideálním případě aktivních, pohyblivých spermií pomocí tenkého katétru přes děložní hrdlo přímo do dělohy. (http://www.ucsfhealth.org/treatments/intra-uterine_insemination).

Úprava spermatu

Před provedením IUI je nezbytné odstranit semennou plasmu k vyhnutí se prostaglandin navozeným kontrakcím dělohy. Inseminace s nezpracovanými spermiemi by mohla způsobit infekci pánve (Boomsma, Heineman et al. 2007). Odstranění semenné plasmy může být dosaženo relativně jednoduchým postupem. Nejčastěji používanou metodou je centrifugování spermií skrz kultivační médium nebo hustotní gradient, po kterém následuje re-suspenze ve vhodném kultivačním médiu. Není jasné, zdali je tento postup nutný u normálních vzorků spermatu před inseminací nebo zdali by bylo dosaženo podobného výsledku při použití celé populace spermií.

Kvalita vzorku

Neexistuje shoda na spodní hranici kvality spermatu, u kterého by se dalo doporučit ICSI spíše než IUI. Autoři definují spodní hranice rozdílně: jako koncentraci spermií na mililitr nebo celkový počet pohyblivých spermií ve vzorku spermatu nebo celkový počet pohyblivých spermií ve vzorku pro inseminaci. Bylo však zjištěno, že podíly úspěšnosti otěhotnění jsou nižší, pokud vzorek spermatu obsahuje méně než 10 milionů spermií celkem (Van Voorhis, Barnett et al. 2001). U inseminačního vzorku, doporučovaná spodní hranice je v rozsahu od 3 milionů pohyblivých spermií (Strandell, Bergh et al. 2003), k 5 milionům (Khalil, Rasmussen et al. 2001) až po 10 milionů (Kahn, von Düring et al. 1992).

Způsob inseminace

Suspenze spermií může být vložena do děložního hrdla, do dělohy, do pobřišnice nebo do vejcovodů. IUI je zdaleka nejběžnější metoda, která je provedena zavedením 0,2-0,5 ml suspenze spermií do dělohy pomocí malého katétru, obvykle bez obrazového vedení. U perfuze (průtok tekutiny určitým prostředím) spermií vejcovody (FSP – fallopian tube sperm perfusion), objem inseminovaného vzorku je 4 ml, aby velký objem tekutiny inseminovaného vzorku zaplnil nejen děložní dutinu a vejcovody, ale také aby se nějaké množství dostalo dokonce dovnitř peritoneální dutiny (Kahn, von Düring et al. 1992). Pro zmrazené sperma, IUI je lepší než intracervikální inseminace (ICI – inseminace dovnitř hrdla dělohy): pravděpodobnost živě narozeného dítěte po 6 inseminačních cyklech je dvounásobně vyšší (Besselink, Farquhar et al. 2008). Ve dvou studiích u pacientů s nevysvětlitelnou neplodností byly výsledky s FSP lepší než s IUI (Kahn, Sunde et al. 1993; Cantineau, Heineman et al. 2003). Pro jiné indikace není dostatek údajů, které naznačují, že FSP je lepší než IUI.

Načasování inseminace

Inseminace může být provedena v různých časových obdobích okolo ovulace a může být provedena jednou nebo vícekrát. Ve většině publikovaných studií, inseminace se provede 32 až 36 h po podání hCG (Fuh, Wang et al. 1997; Robb, Robins et al. 2004; Jarvela, Tapanainen et al. 2010). Předpokládá se, že načasování inseminace vzhledem k ovulaci, je rozhodující pro optimální míru úspěšnosti a proto vznikly studie pro zjištění optimální doby pro inseminaci (Ragni, Somigliana et al. 2004).

V systematickém přehledu nebyl nalezen žádný rozdíl v podílu úspěšnosti otěhotnění na jeden pár se dvěma inseminacemi ve srovnání s jednou (Cantineau, Heineman et al. 2003). V roce 2004 byl proveden průzkum (The European IVF Monitoring Programme), který prokázal, že z 98 388 UIU cyklů provedených v 19 zemích bylo 12 081 úspěšných porodů (12.3% na cyklus), ze kterých 87% byli jednotlivé a 13% vícečetné porody (Andersen, Goossens et al. 2008). Ačkoliv je IUI široce využíváné, nebyly prokázány důkazy účinnosti na mužskou neplodnost (Bensdorp, Cohlen et al. 2007) a stejně tak nebyla prokázáno, že IUI je efektivní v případě nevysvětlené neplodnosti (Steures, van der Steeg et al. 2006). IUI je často zvoleno jako metoda léčby při čekací lhůtě na, nebo namísto *in vitro* fertilizace (IVF).

Ve studii zaměřené na páry s nevysvětlenou a mužskou neplodností se ukázalo, že kombinace super ovulace s folikuly stimulujícím hormonem (FSH) a IUI vedlo k pravděpodobnosti těhotenství třikrát vyšší než pro samotnou inseminaci do děložního krčku. Což je zhruba 12% pravděpodobnost otěhotnění na 1 stimulovaný cyklus. Pro neplodné páry, u kterých žena nemá žádný identifikovaný faktor neplodnosti a muž má pohyblivé spermie, kombinace hyperovulace a IUI je účinný způsob jak docílit těhotenství (Guzick, Carson et al. 1999).

Tudíž ačkoliv evropský report nespecifikuje stimulace, mnoho z IUI cyklů mohou být stimulované. Procento vícečetných těhotenství zůstává neměnné. Průměrné procento úspěšnosti otěhotnění s dárcovskou inseminací je ~4% vyšší, než partnerovou inseminací.

Zdůvodnění

Cílem léčby IUI je zvýšit podíl úspěšnosti početí zvýšením šance že maximum zdravých spermií dosáhne místa oplození. U párů s abnormálním sekretem může být důvodem volby IUI možnost obejít faktor děložního hrdla (Medicine 2006).

Morfologie spermií pro IUI

IUI s nebo bez stimulace vaječníků je zváženo k indikaci pro velké spektrum diagnóz. Nejzřejmější diagnózou je mužská neplodnost, obzvláště v případech kdy je vyžadován dárcí spermatu (Bensdorp, Cohlen et al. 2007). IUI je indikováno také pro ženy s nízkou mírou endometritidy.

V nedávné studii (Van Waart, Kruger et al. 2001) byl proveden strukturní přehled literatury hodnotící předvídanou hodnotu normální morfologie spermií v IUI programech jako předpoklad potenciálu mužské plodnosti. U mužů se známkami subfertility (snížená plodnost) se ukázala být morfologie spermií nejdůležitějším faktorem, přičemž koncentrace a pohyblivost/progresivní pohyblivost se ukázali být také dobrými faktory předvídatelnosti úspěšnosti oplodnění (Ombelet, Bosmans et al. 1997; Gunalp, Onculoglu et al. 2001; Guzik, Overstreet et al. 2001; Menkveld, Wong et al. 2001). Vypočítané hranice ukázaly 4-10% pro morfologii spermií, $13,6 \times 10^6$ / ml pro koncentraci a od 31,8 po 52% pro pohyblivost. Druhá spodní hranice byla vypočítána jako 3-5% pro morfologii, 9×10^6 / ml pro koncentraci a mezi 20% a 30% pro pohyblivost. Protože tyto nižší hranice mají mnohem vyšší pozitivní předpovídanou hodnotu, bylo navrženo, že by se měly používat k identifikaci částečně plodných mužů. Tyto nižší hranice jsou také vhodné pro IVF a IUI. Bylo shrnuto, že používání kombinace těchto parametrů zvýší klinickou hodnotu analýzy spermatu (Montanaro Gauci, Kruger et al. 2001)

5.2. Intracytoplazmatická injekce spermie ICSI

Intracytoplazmatická injekce spermie – ICSI, je druhá nejčastěji používaná technika asistované reprodukce. ICSI je mikromanipulační metoda, která spočívá ve vpravení jedné morfologicky normální spermie do cytoplazmy zralého vajíčka (Morrell and Rodriguez-Martinez 2010). (<http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>).

Poprvé byla tato metoda použita v roce 1992 (Palermo, Joris et al. 1992) a během posledních let, ICSI se stala nejvíce používanou metodou oplodnění a v roce 2004 zabírala metoda ICSI skoro 60% všech hlášených ART (asistenčně reprodukční technologie) cyklů v Evropě (Andersen, Goossens et al. 2008), Austrálii, na Novém Zélandu (Farquhar, Wang et al. 2010) a v USA (Wright, Chang et al. 2007).

ICSI je v současnosti nejvíce účinná metoda oplodnění v případě mužské neplodnosti a umožňuje oplodnění spermatem i s velmi sníženými parametry kvality.

Oplodnění pomocí intracytoplazmatické injekce spermie je technika, díky které je možné použít asistovanou reprodukci nejen u člověka, ale také u ohrožených druhů. V těchto případech se provádí ICSI na myši jako modelovém organismu pro savčí reprodukci (Stein and Schultz 2010). Přežití myšního vajíčka po použití ICSI by bylo však nízké (Ron-El, Liu et al. 1995) bez pomoci piezo-ovládané mikroinjekční pipety (Kimura and Yanagimachi 1995). Při této mikromanipulaci piezoelektrický jev (deformace krystalu v reakci na externě aplikované napětí) pohání mikroinjekční hrot jehly vpřed v přesných a rychlých pohybech. Piezoelektricky-ovládaná mikromanipulace zvyšuje pronikání membrán a tím i ICSI u myši je její hlavní uplatnění (Yoshida and Perry 2007).

U ICSI probíhá hormonální stimulace a odběr vajíček stejně jako u IVF (viz níže). Následuje však příprava spermií a příprava vajíček, které se od klasické IVF liší.

Příprava spermií pro ICSI

Spermie pro ICSI mohou být získány z ejakulátu nebo jednou z chirurgických metod z varlat nebo nadvarlat (TESA – aspirace spermií z varlat, MESA – aspirace spermií z nadvarlat). Získaný vzorek spermatu je nejprve centrifugován a poté promýván. Do centrifugovaných spermií se vloží pipeta a ponechá se tam asi hodinu, během které spermie vcestují do pipety a tím se zajistí, že všechny spermie jsou živé. Pomocí mikropipety se odsaje kapka a z kapky embryolog vybírá nejlépe morfologicky vypadající spermii.

V přirozeném stavu se spermie přes zona pellucida vajíčka dostává pomocí vlastních enzymů a pomocí bičíku. Po průniku dochází k jejich fúzi (splnutí) a bičík spermie a mitochondrie degenerují s vytvořením samčího pronuklea. To je důvodem proč jsou všechny mitochondrie u lidí materského původu. Při ICSI se musí spermii odstranit bičík, protože spermie neprodělává přirozenou cestu přes buněčnou membránu.

Příprava vajíček pro ICSI

Po odběru vajíček by vajíčka podle dnešních výzkumů měla být před samotnou ICSI alespoň 3 hodiny inkubována – tím doběhnou procesy zrání. Odstraňují se 2 vnější vaječné obaly: corona radiata a cumulus oophorus. Vajíčko se obalů zbavuje chemicky a mechanicky. Selektivní bariéra zona pellucida je odstraněna a následně je jedna předem vybraná v ideálním případě morfologicky normální spermie vpravena přímo do cytoplazmy předem připraveného zralého vajíčka. O 3 dny později jsou výsledná embrya přesunuta do dělohy bez chirurgického zákroku, stejně jako u IVF. (<http://www.infertile.com/infertility-treatments/icsi.htm>).

Procento úspěšnosti oplodnění na vajíčko u ICSI je asi 70% - 80%. (http://coe.ucsf.edu/ivf/intracytoplasmic_sperm_injection.html).

Tato metoda je vhodná především pro muže s nedostačujícím spermiogramem: s nízkým počtem spermií, s nízkou pohyblivostí spermií, s anomálním tvarem spermií, se spermiemi neschopnými proniknout do vajíčka (spermie s enzymatickou poruchou). (<http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>). ICSI se také používá na zvýšení pravděpodobnosti oplodnění u mužů s vyšším věkem. Byly popsány změny ve spermatogenezi související s klesajícím objemem spermatu, pohyblivostí spermií a morfologie spermie v závislosti na vzrůstajícím věku (Kidd, Eskenazi et al. 2001), nicméně některé studie potvrzují (Eskenazi, Wyrobek et al. 2003), jiné vyvracejí (Kuhnert and Nieschlag 2004), že koncentrace spermií také klesá v závislosti na vzrůstajícím věku. Pokles v objemu spermatu z 3-22%, pokles v pohyblivosti spermií z 3-37% a pokles v procentech morfologicky normálních spermií ze 4 na 18% byl objeven při srovnání 50letých mužů se 30letými muži ((Kidd, Eskenazi et al. 2001). Také bylo ukázáno, že starší muži mají zvýšené poškození DNA spermie, což může být příčinou neplodnosti (Singh, Muller et al. 2003; Wyrobek, Eskenazi et al. 2006; Schmid, Eskenazi et al. 2007).

Morfologie spermií pro ICSI

Je zásadním předpokladem pro úspěšnost metod asistované reprodukce správná morfologie spermatické buňky? Ukázalo se, že neexistuje jednoznačný názor na to, zdali morfologie spermie přímo ovlivňuje výsledky asistované reprodukce. Některé studie (Nagy, Liu et al. 1995; Nagy, Verheyen et al. 1998) dokazují, že koncentrace, pohyblivost ani morfologie spermií, jako nejdůležitější parametry analyzovaného spermatu, neovlivňují výsledek ICSI. Jiné studie (De Vos, Van De Velde et al. 2003) však vztah mezi morfologií individuální spermie, oplodněním pomocí ICSI a následným těhotenstvím potvrzují a výsledky po injekci morfologicky abnormální spermie prokazují menší úspěšnost oplodnění, otěhotnění a nidace.

Ovšem v případě teratospermie (deformované spermie v semeni) morfologie spermie hraje důležitou roli při embryogenezi. Při srovnání pacientů s více než 95% teratozoospermii a méně než 95% teratozoospermii v semeni se výsledky oplodnění a otěhotnění nijak výrazně nelišily (Mansour, Aboulghar et al. 1995). Avšak zatímco v případě 100% teratospermii v semeni procento úspěšnosti oplodnění a procento rýhování bylo relativně vysoké (oplodnění 50,8% a

rýhování 93,2%), podíly úspěšnosti otěhotnění byly nižší než v cyklech, kde byla injektována normální spermie (17% vs. 27%). Také podíl pokračujících těhotenství byl v případě 100% teratozoospermii velmi nízký (5,88%) a podíl potratů vzrostl (Tasdemir, Tasdemir et al. 1997). Z toho je usuzováno, že abnormální morfologie hlavičky spermie může zobrazovat abnormality ve spermatogenezi, které jsou prokazatelné embryi s nízkým potenciálem nidace. Teratozoospermie se však může lišit v počtu a závažnosti deformací a proto pouze totálně deformovaná spermie je jediný zjevný důvod pro úplné selhání fertilizace (Moomjy, Sills et al. 1998). Podíl úspěšnosti oplodnění klesá zřejmě především s následujícími morfologickými příznaky: krátká oblast akrozómu, kulatá hlavička, a defekt beztvare hlavičky (Shulman, Frenkel et al. 1998). Injekce spermie s defektem beztvare hlavičkami vedla k nejnižšímu podílu úspěšnosti oplodnění a ke špatné kvalitě embrya.

Kvalita embrya a následně výsledek otěhotnění jsou také ohrožovány v případě defektů krčku spermie (Rawe, Terada et al. 2002). Předpokládá se, že změna ve spojení hlava-bíček je v tomto případě způsobena dysfunkcí centriol. To způsobuje nedostatečnou tvorbu vřeténka spermie, chybějící syngamii (splnutí pohlavních rozmnožovacích buněk) a rýhování nebo dokonce vadné embrya vedoucí k předčasnému ukončení těhotenství. Centrozom spermie poskytuje aktivní dělicí centrum pro embryo a hraje významnou roli v prvním dělení embrya při syngamii (Sathananthan, Ratnam et al. 1996). Při oplodnění je proximální centriola spermie nesena do oocyty, zde přetrvává během dekonzenzace spermie a organizuje astrální mikrotubuly spermie a první mitotické vřeténko (Ng, Liow et al. 1993). Ukázalo se, že nepohyblivé spermie mají více defektních centriol než pohyblivé spermie. Dysfunkce centrioly může tedy způsobit nižší podíl fertilizace a může také ohrozit vývoj embrya v IVF a ICSI (Ng, Liow et al. 1993; (Palermo, Cohen et al. 1996; Wall, Marks et al. 1996).

Jeden z dalších defektních typů je makrocefalická spermie neboli spermie s velkou hlavičkou. Tyto morfologické formy jsou často spojovány s vysokým výskytem chromozomálních abnormalit, a proto tento typ defektu morfologie spermie často vede ke sníženým podílům úspěšnosti oplodnění a otěhotnění (Kahraman, Akarsu et al. 1999). Makrocefalická spermie také ukázala vysoce zvýšenou míru aneuploidie (genomová mutace – nedostatek či nadbytek chromozomů v buňce) nebo diploidie (přítomnost dvou sad chromozomů v buňce) a je předpokládáno, že se vyskytují abnormality v meióze I. a II., které nakonec vedou k selhání jaderného dělení. Někteří autoři se shodují, že ICSI by nemělo být doporučováno pro tento typ defektu (Viville, Mollard et al. 2000; Devillard, Metzler-Guillemain et al. 2002).

Ačkoliv morfologicky abnormální spermie nezbytně neodráží genetickou abnormalitu mužských gamet (Martin and Rademaker 1988) několik studií (Lee, Kamiguchi et al. 1996; Bernardini, Martini et al. 1997; Calogero, De Palma et al. 2001; Rubio, Gil-Salom et al. 2001; Ryu, Lin et al. 2001; Kunathikom, Rattanachaiyanont et al. 2002) zaznamenalo zvýšené riziko chromozomových abnormalit ve spermiích použitých při oplodnění pomocí ICSI.

Globozoospermie (spermie s kulatou hlavičkou) je také asociována se zvýšeným počtem abnormálních chromozomových struktur a zlomů řetězce DNA (Vicari, Perdichizzi et al. 2002).

V případě azoospermie byla vyvinuta technologie pro azoospermické pacienty k otěhotnění pomocí intacytoplazmatické injekce spermie chirurgicky získané z varlat nebo nadvarlat.

Spermie může být získána mikrochirurgickou aspirací (nasátím) spermií z nadvarlete (MESA) vzhledem ke kongenitální bilaterální absenci chámovodů, neúspěšné vasoepididymostomii a jinak nenapravitelným překážkám (Tournaye, Devroey et al. 1994).

Je několik metod sběru spermií pro ICSI: MESA, TESA (aspirace spermií z varlat) nebo PESA (perkutánní aspirace spermií z nadvarlat) (Shrivastav, Nadkarni et al. 1994).

Spermie mohou také být sebrány přímo z varlat, pokud jsou nadvarlata nepřístupná nebo ve varlatech nejsou přítomné žádné pohyblivé spermie (Devroey, Liu et al. 1994).

Vysoké procento úspěšnosti oplodnění a střední procento úspěšnosti otěhotnění může být docíleno jak při obstrukční tak i při neobstrukční formě azoospermie (Palermo, Schlegel et al. 1999), ale kvalita spermií získaných z nadvarlat se může lišit od těch získaných z varlat. Bylo zaznamenáno vysoké procento potratů při použití spermií z varlat (Ghazzawi, Sarraf et al. 1998; Pasqualotto, Rossi-Ferragut et al. 2002).

Při srovnání spermií získaných pomocí MESA a TESA bylo zjištěno, že spermie z varlat pro ICSI měly podstatně větší procento potratů než spermie z nadvarlat (35,7% oproti 12,5%).

Z toho vyplývá, že původ chirurgicky získaných spermií má vliv na úspěch asistované reprodukce i když spermatogeneze probíhá podle všeho normálně. Významně větší poměr potratů po ICSI se spermiemi pocházejícími z varlat než se spermiemi pocházejícími z nadvarlat v případech obstrukční azoospermie naznačuje, že nezralost spermií pocházející z varlat může ovlivňovat vývoj embrya (Buffat, Patrat et al. 2006).

5.3. *In vitro* fertilizace - IVF

In vitro fertilizace je jedna z nejpoužívanějších metod ve výzkumu, obzvláště na laboratorních myších. Myši jako modelové organismy se používají nejen k předpovědi úspěšnosti oplození vajíčka spermiemi s poškozeným DNA pomocí *in vitro* (Ahmadi and Ng 1999; Perez-Crespo, Moreira et al. 2008; Hourcade, Perez-Crespo et al. 2010), ke kryokonzervaci spermií (Mochida, Ohkawa et al. 2005; Bath 2011), ale také ke sledování vývoje embryí oplodněním spermiemi s navozenými patologiemi (Jannes, Spiessens et al. 1998; Sasagawa, Ichiyanagi et al. 1998). IVF a kryokonzervace embryí hrají také důležitou roli při udržování genetické rozmanitosti ohrožených druhů při správě jedinců jak v zajetí tak i přírodních populacích. (Wildt, 1992; Wildt et al, 1992).

In vitro fertilizace – IVF, je jedna z metod asistované reprodukce nazývaná také jako mimotělní oplodnění nebo oplodnění ve zkumavce. Byla vyvinuta již před více než 25 lety a je stále nejvíce používanou z postupů ART (asistovaných reprodukčních technik). (<http://www.fertilizace.cz/ivf.html>).

IVF probíhá ve 4 fázích: hyperovulace, odběr vajíček, inseminace a embryotransfer.

Hyperovulace (hormonální stimulace vaječníků) / u myši superovulace

Hormonální stimulace se provádí u lidí pro zvýšení úspěšnosti léčby. U laboratorních zvířat, například u myši, se provádí pro stimulaci řízené ovulace s cílem následného odběru velkého počtu vajíček (myš 50-100). Pomocí hormonální stimulace se vyvolá ve vaječnících tvorba a zrání většího počtu vajíček ve folikulech (váčky s vajíčky ve vaječníku) (<http://www.ivf-motol.cz/ivf.aspx>).

Na dozrávání se podílejí hormony hypotalamu, hypofýzy a vaječníku. Hypotalamus produkuje GnRH (gonadotropin releasing hormon -gonadotropiny uvolňující hormon), který stimuluje adenohipofýzu (přední lalok hypofýzy), který dekretuje gonadotropiny: FSH (folikuly stimulující hormon), který zajišťuje růst a zrání Graafova folikulu a LH (luteinizační hormon), který zajišťuje dozrání a prasknutí Graafova folikulu (ovulaci) (Belchetz, Plant et al. 1978). FSH spolu s LH podporují sekreci estrogenů folikulem. Gonadotropiny řídí zrání folikulů. Rostoucí folikul produkuje estrogen, který zpětně tlumí uvolnění hormonu z hypotalamu. Tato regulace způsobuje, že při přirozeném cyklu dozraje u člověka pouze jedno vajíčko.

Dnes se k hyperstimulaci žen nejčastěji používají léky, které obsahují GnRH. Provádí se přitom ultrazvuková kontrola zrání vajíček v ovariu a indukce ovulace pomocí hCG (lidský choriový gonadotropin). Používají se zejména GnRH agonistické a antagonistické hormony pro lepší kontrolu exogenní stimulace pomocí útlumu produkce endogenních hormonů (Roth, Schricker et al. 2001; Rashid, Ong et al. 2008).

Odběr vajíček

Vajíčka se po dosažení optimálního stupně vývoje získávají z vaječníků ženy transvaginální punkcí a aspirací. Odběr oocytů se provádí pomocí ultrazvukové sondy poševní cestou. Je to výkon, trvající přibližně 20 minut. Počet ovariálních folikulů a získaných vajíček závisí na individuální reakci tkáně vaječníků. V embryologické laboratoři jsou vajíčka uložena do kultivačního systému, který zabezpečuje vhodné prostředí pro další vývoj (<http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#ovum>).

Inseminace v závislosti na kvalitě spermioqramu

Klasická metoda IVF se provádí, pokud jsou dostačující výsledky spermioqramu. Požadované hodnoty spermioqramu podle WHO 2010 jsou: objem ejakulátu alespoň 1,5 ml; pH 7,2 až 8; celková pohyblivost spermií alespoň 40%; vitalita spermií 58% a více; počet spermií na 1 ml ejakulátu by měl být alespoň 15×10^6 ; přičemž celkový počet spermií minimálně 39×10^6 a minimální počet spermií s normální morfologií 4%. Získaná vajíčka jsou umístěna do zkumavek s kultivačním médiem a následně oplozována přidáním zpracovaných spermií partnera nebo dárce. Při klasické IVF jsou vajíčka po krátké době tzv. preinkubace (cca 2-6 hod) inseminována partnerovými spermiemi. Spermie prodělávají před inseminací přípravu, která spočívá v opakovaném proplachování a aktivním vycestování spermií do čistého roztoku. Takto oddělené nejvyšší kvality spermie se přidávají do roztoku s vajíčky v množství cca 50.000 - 100.000 spermií na jedno vajíčko. K oplodnění dochází spontánně, spermie

vlastním pohybem docestují k vajíčku a pronikají jeho obaly. Společná kultivace vajíček a spermií trvá 16-20 hodin. Po této době zjišťuje embryolog úspěšnost fertilizace, které je charakterizováno přítomností dvou prvojader v cytoplasmě. Po přenesení oplodněných vajíček do čerstvého kultivačního roztoku dochází za dalších 24 hodin k jejich rýhování (dělení). (<http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#inseminace>). Embrya jsou ve stádiu dvoubuněčná, čtyřbuněčná až osmibuněčná. Zvýšení úspěšnosti přináší prodloužená kultivace embryí.

Pokud jsou parametry spermioqramu nedostačující (nesplňují požadované normy WHO) nebo se jedná o tzv. "imunologický faktor neplodnosti" (přítomné imunologické protilátky negativně ovlivňují pohyb spermií a dochází i k narušení procesu splynutí pohlavních buněk při fertilizaci a může být negativně ovlivněn i vývoj embrya)

(<http://www.crmzlin.cz/page/1781.co-je-neplodnost-a-jeji-priciny>), nemohlo by k oplození vajíček výše popsáním způsobem dojít, a proto se v těchto případech používají jiné metody asistované reprodukce. (viz výše: ICSI, IUI).

Prodloužená kultivace embryí

Ve speciálním kultivačním médiu je možné kultivovat embrya do nejvyššího stádia vývoje, kterého lze v laboratoři dosáhnout, až do tzv. blastocysty. Blastocysta u člověka je 70-100 buněčné stádium a skládá se z vnitřní masy buněk – embryoblastu (tato část embrya se využívá ve výzkumu kmenových buněk) a trofoblastu - vrstvy buněk obklopující embryoblast a prvotní tělní dutinu (blastocel). Embryoblast dává vznik vlastnímu plodu a z trofoblastu se vyvíjí velká část placenty. Kultivace do tohoto stádia trvá přibližně 5 – 6 dní. Prodloužená kultivace umožňuje transferovat nejkvalitnější embrya s největším potenciálem implantace. Sníží se tak pravděpodobnost zavedení embryí s omezenou schopností buněčného dělení. Embrya jsou transferována do připravené děložní sliznice a mají vyšší šanci na uchycení. Současně pozdější transfer embrya je podobnější přirozené situaci, kdy se embryo dostává do děložní dutiny rovněž 5-6. den po oplodnění. Sliznice je v této době na implantaci nejlépe připravena. Prodloužená kultivace zvyšuje pravděpodobnost otěhotnění (<http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#kultivace>).

Embryotransfer

Po několika dnech kultivace, běžně po 2-5 dnech, probíhá přenos embrya ve stádiu 2-8 buněk. Embryotransfer je výkon, při kterém se maximálně 2 embrya přenášejí tenkou kanylou do dělohy pacientky (<http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#embryotransfer>). Podle ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) bylo roku 2005 bylo v České Republice 1425 IVF cyklů a podíl úspěšnosti otěhotnění byl 37,9% na transfer (Nyboe Andersen, Goossens et al. 2009).

Kryokonzervace embryí

Při zisku více než 3 embryí, je možno zbylá embrya kryokonzervovat (zamrazit) a ponechat pro pacientku k pozdějšímu transferu. V případě ovariálního hyperstimulačního syndromu či

nevhodných podmínkách pro transfer (např. nízká sliznice děložní) apod. se zamrazují všechna embrya. Zamrazená embrya se uchovávají při teplotě -196 °C v tekutém dusíku. Po rozmrazení je asi 75% embryí vhodných k další kultivaci či transferu, 25% může být poškozeno mrazícím procesem či ustává po rozmrazení v dalším vývoji. Pravděpodobnost otěhotnění po přenosu zmrazených-rozmražených embryí (KET = kryoembryotransfer) je obvykle asi poloviční oproti přenosu čerstvých embryí.

Morfologie spermie a klasická IVF

In vitro fertilizace (IVF) vedla k vývoji modelu, při kterém by některé prvky ovlivňující oplodnění mohly být studovány ve více detailech. Roku 1986 byla uskutečněna studie, která srovnávala morfologii normální spermie s IVF (Kruger, Menkveld et al. 1986). V této studii měli všichni pacienti koncentraci spermií větší než 20×10^6 /ml a parametry pohyblivosti více než 30%, aby se vyloučil možný účinek dalších parametrů. Hranice morfologie spermií byla určena na 14%. Podíl úspěšnosti oplodnění ve skupině s více než 14% normální morfologií spermií byl více než 82% a ve skupině s méně než 14% normální morfologií byl podíl úspěšnosti oplodnění spermií 37%.

Většina studií potvrzuje, že normální morfologie spermií (zahrnující morfologii akrozómu) hraje roli v určování potenciálu oplodnění. Při použité hranice 5% normální morfologie spermií, několik studií poskytlo data k předpovězení úspěšnosti oplodnění pomocí IVF (Kruger, Acosta et al. 1988; Oehninger, Acosta et al. 1988; Enginsu, Pieters et al. 1992; Yue, Meng et al. 1995; Figueiredo, Tavares et al. 1996).

Při klasické *in vitro* fertilizaci (IVF) se úbytek koncentrace spermií, progresivní pohyblivost spermií a obzvláště morfologie spermií (podle Tygerbergových norem) ukázaly být významnými hodnotami při předpovídání podílů úspěšnosti oplodnění a otěhotnění (Kruger, Menkveld et al. 1986; Kruger, Acosta et al. 1988; Ombelet, Fourie et al. 1994; Tasdemir, Tasdemir et al. 1997; Coetzee, Kruger et al. 1998). Zejména morfologie spermií má důsledky na podíly úspěšnosti oplodnění a otěhotnění (Coetzee, Kruger et al. 1998).

Bylo objeveno, že špatné morfologie spermie (obzvláště abnormality hlavičky spermie) vedou ke špatné kvalitě embrya s následným negativním důsledkem na výsledek otěhotnění (Parinaud, Mieusset et al. 1993). Morfologie spermie pravděpodobně ovlivňuje také vývoj blastocysty (Miller and Smith 2001) a podíl úspěšnosti rýhování blastomeru (Salumets, Suikkari et al. 2002). Protikladná studie však ukázala, že WHO normy ani Tygerbergovy normy nesouvisí s podíly úspěšnosti oplodnění, vývojem embrya nebo těhotenstvím u párů podstupujících IVF (Host, Lindenberg et al. 1999; Host, Ernst et al. 2001).

6. Závěr

Správný průběh spermatogeneze má nezanedbatelný vliv na vývoj spermatické buňky a její morfologii. V této bakalářské práci byla popsána morfologie spermatické buňky a shrnuta klasifikace normospermie a patologické spermie podle WHO. Následně byly popsány běžné patologie spermií a základní metody asistované reprodukce k prokázání na základě morfologie spermií, která ovlivňuje výsledky IUI, ICSI a IVF.

Při hodnocení výsledků s IUI, skupina s 0-4% normální morfologií spermií byla skupinou s nejnižšími podíly úspěšnosti otěhotnění u IUI. Což ovšem neznamená, že otěhotnění pro tuto skupinu není možné, jen šance na otěhotnění jsou významně nižší. Je také důležité poznamenat, že ostatní parametry spermatu přispívají nebo ubírají na úspěšnosti otěhotnění. To znamená, pokud ostatní parametry spermatu jsou také pod doporučenou limitní hranicí, šance na úspěch jsou ještě nižší. Při normální koncentraci spermií na ml a pohyblivosti vyšší než 50%, tyto parametry by mohly kompenzovat morfologii spermií 0-4% s významně větší šancí otěhotnění než IUI. Tyto morfologické hranice mohou být také použity při nasměrování pacientů k IVF nebo ICSI.

Hlavička spermie, jako jedna z morfologických komponent spermie výrazně ovlivňuje výsledky asistované reprodukce, protože díky hlavičce dochází k akrozomální reakci se zona Pellucida vajíčka a k následnému vývoji embrya. Některé morfologické abnormality hlavičky (makrocefalická hlavička, globozoospermie aj.) jsou často spojovány s vysokým výskytem chromozomálních abnormalit. Někteří autoři se shodují, že při takovýchto defektech by neměla být doporučována metoda ICSI, protože se v případě úspěšnosti oplodnění a otěhotnění může vést ke genomovým mutacím u potomků (Klinefertův syndrom, Down syndrom, XX male syndrom). V případě defektů v oblasti krčku spermie bylo prokázáno, že je ohrožována počáteční embryogeneze, a proto i primární výsledek otěhotnění. Centriola je jednou z důležitých komponent krčku spermie a proto dysfunkce centriol ovlivňuje negativním způsobem tvorbu vřeténka a syngamii, což může vést až k potratu. V případě aspirace spermií pomocí MESA/TESA/PESA bylo zaznamenáno potenciální vyšší riziko potratů při aspiraci spermií z varlat. To může být zapříčiněno tím, že nezralost spermií pocházejících z varlat může negativně ovlivňovat vývoj embrya.

Některé studie však vyvracejí, že by morfologie spermie (podle WHO a Tygerbergových norem) měla nezbytně vztah k výsledkům ICSI. Tyto výsledky mohou být pravděpodobně vysvětleny tím, že během cyklu ICSI, se embryolog snaží vybrat spermii se zjevně normální morfologií a pohyblivostí. Podle těchto studií, morfologie spermie není kritickým faktorem pro oplodnění pomocí ICSI v některých případech patologií, protože mnoho z procesů, jako je například navázání se a průnik do zona pellucida, jsou vynechány. Proto je při metodě ICSI důležité, aby se embryolog snažil vybrat co nejnormálněji morfologicky vypadající spermii, díky které jsou šance na úspěšnost oplodnění a otěhotnění mnohonásobně vyšší.

Zároveň lze soudit, že nízká morfologie spermií, určena podle WHO norem, slouží jako varování, že může být očekáván snížený podíl úspěšnosti oplodnění pomocí IVF. V těchto případech je doporučováno oplodnění pomocí ICSI. Ke zlepšení podílu úspěšnosti pokračujícího těhotenství je nicméně krajně nezbytné (založeno na literatuře) vybrat

individuální spermii použitou u ICSI, na základech normální morfologie podle principů norem (Kruger, Acosta et al. 1988; Menkveld, Stander et al. 1990).

Procento normální morfologie spermií nemusí být naprostou předpovídající hodnotou podílů úspěšnosti oplodnění a otěhotnění, ale zůstává nejspolehlivějším ukazatelem při diagnostikování míry mužské plodnosti. Díky zjištění procenta spermií s normální morfologií může být vybrána taková metoda asistované reprodukce, aby co nejvíce zvýšila pravděpodobnost úspěšnosti oplodnění, transferu a otěhotnění.

Podobné morfologické analýzy a vědecké studie se dělají i u jiných zástupců savčích modelových organismů (např. u myší), s následným využitím získaných dat a poznatků pro lidskou medicínu. Nicméně hlavním cílem této bakalářské práce bylo se zaměřit detailněji na člověka a lidskou spermatickou buňku.

7. Použitá literatura

1. Aafjes, J. H. and J. C. van der Vijver (1976). "[354 men with impaired fertility]." Nederlands tijdschrift voor geneeskunde **120**(20): 865-873.
2. Aafjes, J. H., J. C. van der Vijver, et al. (1977). "Serum gonadotrophins, testosterone and spermatogenesis in subfertile men." Acta endocrinologica **86**(3): 651-658.
3. Aafjes, J. H., J. C. van der Vijver, et al. (1978). "Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia." British medical journal **1**(6108): 289-290.
4. Aafjes, J. H., J. M. Vels, et al. (1980). "Fertility of rats with artificial oligozoospermia." Journal of reproduction and fertility **58**(2): 345-351.
5. Adham, I. M., K. Nayernia, et al. (2001). "Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2)." Molecular human reproduction **7**(6): 513-520.
6. Ahmadi, A. and S. C. Ng (1999). "Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa." The Journal of experimental zoology **284**(6): 696-704.
7. Alberts, B. (1998). Essential cell biology : an introduction to the molecular biology of the cell. New York ; London, Garland Pub.
8. Andersen, A. N., V. Goossens, et al. (2008). "Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE." Human reproduction **23**(4): 756-771.
9. Baccetti, B., S. Capitani, et al. (2001). "Genetic sperm defects and consanguinity." Human reproduction **16**(7): 1365-1371.
10. Baccetti, B., S. Capitani, et al. (2002). "Recent advances in human sperm pathology." Contraception **65**(4): 283-287.
11. Balhorn, R., S. Weston, et al. (1984). "DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins." Experimental cell research **150**(2): 298-308.
12. Bath, M. L. (2011). "Optimized cryopreservation of mouse sperm based on fertilization rate." The Journal of reproduction and development **57**(1): 92-98.
13. Belchetz, P. E., T. M. Plant, et al. (1978). "Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone." Science **202**(4368): 631-633.
14. Bendsorp, A. J., B. J. Cohlen, et al. (2007). "Intra-uterine insemination for male subfertility." Cochrane database of systematic reviews(3): CD000360.
15. Bernardini, L., E. Martini, et al. (1997). "Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization." Molecular human reproduction **3**(5): 431-438.
16. Besselink, D. E., C. Farquhar, et al. (2008). "Cervical insemination versus intra-uterine insemination of donor sperm for subfertility." Cochrane database of systematic reviews(2): CD000317.
17. Blackshaw, A. W. (1953). "The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension." The Journal of general physiology **36**(4): 449-462.
18. Bonde, J. P., E. Ernst, et al. (1998). "Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners." Lancet **352**(9135): 1172-1177.
19. Boomsma, C. M., M. J. Heineman, et al. (2007). "Semen preparation techniques for intrauterine insemination." Cochrane database of systematic reviews(4): CD004507.
20. Buffat, C., C. Patrat, et al. (2006). "ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction." Human reproduction **21**(4): 1018-1024.

21. Calogero, A. E., A. De Palma, et al. (2001). "High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome." Human reproduction **16**(7): 1433-1439.
22. Cantineau, A. E., M. J. Heineman, et al. (2003). "Single versus double intrauterine insemination (IUI) in stimulated cycles for subfertile couples." Cochrane database of systematic reviews(1): CD003854.
23. Carlsen, E., A. Giwercman, et al. (1992). "Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years." BMJ **305**(6854): 609-613.
24. Ceylan, C., G. G. Ceylan, et al. (2010). "The azoospermia factor locus-c region was found to be related to Klinefelter syndrome in Turkish patients." Genetics and molecular research : GMR **9**(2): 1229-1233.
25. Clermont, Y., E. Einberg, et al. (1955). "The perforatorium; an extension of the nuclear membrane of the rat spermatozoon." The Anatomical record **121**(1): 1-12.
26. Coetzee, K., T. F. Kruger, et al. (1998). "Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review." Human reproduction update **4**(1): 73-82.
27. Cooper, T. G., E. Noonan, et al. (2010). "World Health Organization reference values for human semen characteristics." Human reproduction update **16**(3): 231-245.
28. Cooper, T. G., C. H. Yeung, et al. (2004). "Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology." Human reproduction **19**(10): 2283-2288.
29. Correa-Perez, J. R., R. Fernandez-Pelegrina, et al. (2004). "Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrostermia." Fertility and sterility **81**(4): 1148-1150.
30. Costoya, J. A., R. M. Hobbs, et al. (2004). "Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells." Nature genetics **36**(6): 653-659.
31. Dadoune, J. P., M. J. Mayaux, et al. (1988). "Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics." Andrologia **20**(3): 211-217.
32. De Vos, A., H. Van De Velde, et al. (2003). "Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection." Fertility and sterility **79**(1): 42-48.
33. Devillard, F., C. Metzler-Guillemain, et al. (2002). "Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases." Human reproduction **17**(5): 1292-1298.
34. Devroey, P., J. Liu, et al. (1994). "Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection." Fertility and sterility **62**(3): 639-641.
35. Dooher, G. B. and D. Bennett (1973). "Fine structural observations on the development of the sperm head in the mouse." The American journal of anatomy **136**(3): 339-361.
36. Druart, X., J. Cownie, et al. (2009). "In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract." Reproduction **138**(1): 45-53.
37. Dym, M. (1994). "Spermatogonial stem cells of the testis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(24): 11287-11289.
38. Edirisinghe, W. R., A. R. Murch, et al. (1998). "Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes following intracytoplasmic sperm injection using spermatozoa from a globozoospermic man." Human reproduction **13**(11): 3094-3098.
39. Enginsu, M. E., M. H. Pieters, et al. (1992). "Male factor as determinant of in-vitro fertilization outcome." Human reproduction **7**(8): 1136-1140.

40. Escalier, D. (2001). "Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis." Human reproduction update **7**(2): 191-210.
41. Escalier, D. (2003). "New insights into the assembly of the periaxonemal structures in mammalian spermatozoa." Biology of reproduction **69**(2): 373-378.
42. Escalier, D. (2006). "[Animal models: Candidate genes for human male infertility]." Gynecologie, obstetrique & fertilite **34**(9): 827-830.
43. Escalier, D. (2006). "Arrest of flagellum morphogenesis with fibrous sheath immaturity of human spermatozoa." Andrologia **38**(2): 54-60.
44. Escalier, D. (2006). "Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies." Human reproduction update **12**(4): 449-461.
45. Escalier, D. and M. Albert (2006). "New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity." Fertility and sterility **86**(1): 219 e211-219.
46. Eskenazi, B., A. J. Wyrobek, et al. (2003). "The association of age and semen quality in healthy men." Human reproduction **18**(2): 447-454.
47. Farquhar, C. M., Y. A. Wang, et al. (2010). "A comparative analysis of assisted reproductive technology cycles in Australia and New Zealand 2004-2007." Human reproduction **25**(9): 2281-2289.
48. Fawcett, D. W., W. A. Anderson, et al. (1971). "Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head." Developmental biology **26**(2): 220-251.
49. Figueiredo, H., A. Tavares, et al. (1996). "Isolated teratozoospermia and in vitro fertilization." Journal of assisted reproduction and genetics **13**(1): 64-68.
50. Filippini, D. and R. Feil (2009). "Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia." Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society **4**(1): 27-30.
51. Fleming, A. D., R. Yanagimachi, et al. (1981). "Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*." Journal of reproduction and fertility **63**(2): 509-514.
52. Fraser, L. R. (1977). "Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation." The Journal of experimental zoology **202**(3): 439-444.
53. Freund, M. (1962). "Interrelationships among the characteristics of human semen and factors affecting semen-specimen quality." Journal of reproduction and fertility **4**: 143-159.
54. Fuh, K. W., X. Wang, et al. (1997). "Intrauterine insemination: effect of the temporal relationship between the luteinizing hormone surge, human chorionic gonadotrophin administration and insemination on pregnancy rates." Human reproduction **12**(10): 2162-2166.
55. Gandini, L., F. Lombardo, et al. (2000). "Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa." Human reproduction **15**(4): 830-839.
56. Ghazzawi, I. M., M. G. Sarraf, et al. (1998). "Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection." Human reproduction **13**(2): 348-352.
57. Gianotten, J., M. P. Lombardi, et al. (2004). "Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding." Human reproduction update **10**(6): 533-539.
58. Gilbert, S. F. (2006). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates ; Basingstoke : Palgrave [distributor].
59. Grimes, D. A. and L. M. Lopez (2007). ""Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science." Fertility and sterility **88**(6): 1491-1494.

60. Grootegoed, J. A., W. M. Baarends, et al. (1998). "Knockout mouse model and gametogenic failure." Molecular and cellular endocrinology **145**(1-2): 161-166.
61. Gunalp, S., C. Onculoglu, et al. (2001). "A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds." Human reproduction **16**(1): 110-114.
62. Guzick, D. S., S. A. Carson, et al. (1999). "Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network." The New England journal of medicine **340**(3): 177-183.
63. Guzick, D. S., J. W. Overstreet, et al. (2001). "Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men." The New England journal of medicine **345**(19): 1388-1393.
64. Hewitson, L. (2004). "Primate models for assisted reproductive technologies." Reproduction **128**(3): 293-299.
65. Hightower, J. A., F. R. Boockfor, et al. (1999). "The standard medical microscopic anatomy course: histology circa 1998." The Anatomical record **257**(3): 96-101.
66. Hishinuma, M. and J. Sekine (2004). "Influence of theophylline supplementation on oocyte penetration of canine epididymal spermatozoa." The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science **66**(11): 1417-1419.
67. Ho, H. C. and S. Wey (2007). "Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis." Microscopy research and technique **70**(8): 719-723.
68. Host, E., E. Ernst, et al. (2001). "Morphology of spermatozoa used in IVF and ICSI from oligozoospermic men." Reproductive biomedicine online **3**(3): 212-215.
69. Host, E., S. Lindenberg, et al. (1999). "Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria." Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica **78**(6): 526-529.
70. Hourcade, J. D., M. Perez-Crespo, et al. (2010). "Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage." Reproductive biology and endocrinology : RB&E **8**: 9.
71. <http://click4biology.info/c4b/11/11.4/spermatogenesis2.gif>
72. http://coe.ucsf.edu/ivf/intracytoplasmic_sperm_injection.html
73. <http://emedicine.medscape.com/article/437884-overview>
74. <http://image.wistatutor.com/content/reproduction-in-animals/spermatogenesis-and-spermiogenesis-stages.jpeg>
75. http://infertility.about.com/od/infertilitytreatments/a/what_is_IUI.htm
76. <http://www.androcare.cz/neplodnost.html>
77. <http://www.crmzlin.cz/page/1781.co-je-neplodnost-a-jeji-priciny>
78. <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato05.html#spermiohistogenese>
79. <http://www.fertilizace.cz/ivf.html>
80. <http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#embryotransfer>
81. <http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#inseminace>
82. <http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#kultivace>
83. <http://www.fertilizace.cz/laboratorni-metody.html#ovum>
84. <http://www.infertile.com/infertility-treatments/icsi.htm>
85. <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/iju/vol2n1/sperm.xml>
86. <http://www.ivf-motol.cz/ivf.aspx>
87. <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>
88. <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>
89. http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_3/data/text/MA_txt6-1-1-2.xml

90. http://www.oligospermia.com/treatment/Low_Sperm_Count.htm
91. <http://www.repromeda.cz>
92. <http://www.uwyo.edu/wjm/repro/spermat.htm>
93. Chemes, E. H. and Y. V. Rowe (2003). "Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men." Human reproduction update **9**(5): 405-428.
94. Chemes, H. E. (2000). "Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men." Journal of andrology **21**(6): 799-808.
95. Chia, S. E., C. N. Ong, et al. (1994). "Effects of cigarette smoking on human semen quality." Archives of andrology **33**(3): 163-168.
96. Jannes, P., C. Spiessens, et al. (1998). "Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice." Human reproduction **13**(2): 372-375.
97. Jarow, J. P. (1994). "Life-threatening conditions associated with male infertility." The Urologic clinics of North America **21**(3): 409-415.
98. Jarow, J. P., M. A. Espeland, et al. (1989). "Evaluation of the azoospermic patient." The Journal of urology **142**(1): 62-65.
99. Jarvela, I. Y., J. S. Tapanainen, et al. (2010). "Improved pregnancy rate with administration of hCG after intrauterine insemination: a pilot study." Reproductive biology and endocrinology : RB&E **8**: 18.
100. Jouannet, P., B. Ducot, et al. (1988). "Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics." International journal of andrology **11**(5): 379-394.
101. Kahn, J. A., A. Sunde, et al. (1993). "Fallopian tube sperm perfusion (FSP) versus intra-uterine insemination (IUI) in the treatment of unexplained infertility: a prospective randomized study." Human reproduction **8**(6): 890-894.
102. Kahn, J. A., V. von Düring, et al. (1992). "Fallopian tube sperm perfusion: first clinical experience." Human reproduction **7 Suppl 1**: 19-24.
103. Kahraman, S., C. Akarsu, et al. (1999). "Fertility of ejaculated and testicular megalohad spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection." Human reproduction **14**(3): 726-730.
104. Karp, G. (2005). Cell and molecular biology : concepts and experiments. New York ; Chichester, Wiley.
105. Khalil, M. R., P. E. Rasmussen, et al. (2001). "Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles." Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica **80**(1): 74-81.
106. Kidd, S. A., B. Eskenazi, et al. (2001). "Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature." Fertility and sterility **75**(2): 237-248.
107. Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995). "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse." Biology of reproduction **52**(4): 709-720.
108. Kobayashi, H., A. Sato, et al. (2007). "Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients." Human molecular genetics **16**(21): 2542-2551.
109. Kolarova, J., R. Vrtel, et al. (2003). "[Microdeletion of the azoospermia factor as one of the causes of male infertility]." Casopis lekaru ceskych **142**(4): 211-215.
110. Kolettis, P. N. (2002). "The evaluation and management of the azoospermic patient." Journal of andrology **23**(3): 293-305.
111. Kruger, T. F., A. A. Acosta, et al. (1988). "Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization." Fertility and sterility **49**(1): 112-117.

112. Kruger, T. F., R. Menkveld, et al. (1986). "Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization." Fertility and sterility **46**(6): 1118-1123.
113. Kuhnert, B. and E. Nieschlag (2004). "Reproductive functions of the ageing male." Human reproduction update **10**(4): 327-339.
114. Kunathikom, S., M. Rattanachaiyanont, et al. (2002). "Analysis of aneuploidy in mini-percoll gradient centrifuged human sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using fluorescence in situ hybridization." The journal of obstetrics and gynaecology research **28**(4): 224-230.
115. Larsen, L., T. Scheike, et al. (2000). "Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team." Human reproduction **15**(7): 1562-1567.
116. Lee, J. D., Y. Kamiguchi, et al. (1996). "Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes." Human reproduction **11**(9): 1942-1946.
117. Leridon, H. and R. Slama (2008). "The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology." Human reproduction **23**(6): 1312-1319.
118. Lhuillier, P., B. Rode, et al. (2009). "Absence of annulus in human asthenozoospermia: case report." Human reproduction **24**(6): 1296-1303.
119. Maekawa, M., K. Kamimura, et al. (1996). "Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function." Archives of histology and cytology **59**(1): 1-13.
120. Machev, N., P. Gosset, et al. (2005). "Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia." Cytogenetic and genome research **111**(3-4): 352-357.
121. Mansour, R. T., M. A. Aboulghar, et al. (1995). "The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection." Fertility and sterility **64**(5): 982-986.
122. Marques, C. J., F. Carvalho, et al. (2004). "Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis." Lancet **363**(9422): 1700-1702.
123. Marques, C. J., P. Costa, et al. (2008). "Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia." Molecular human reproduction **14**(2): 67-74.
124. Martin, R. H. and A. Rademaker (1988). "The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans." Mutation research **207**(3-4): 159-164.
125. Martin, R. H., A. W. Rademaker, et al. (2003). "A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia." Biology of reproduction **69**(2): 535-539.
126. Mastromonaco, G. F., M. A. Hay, et al. (2002). "The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa." Theriogenology **57**(3): 1123-1134.
127. Matzuk, M. M. and D. J. Lamb (2002). "Genetic dissection of mammalian fertility pathways." Nature cell biology **4 Suppl**: s41-49.
128. Medicine, T. P. C. o. t. A. S. f. R. (2006). "Optimal evaluation of the infertile female." Fertility and sterility **86**(5 Suppl 1): S264-267.
129. Menkveld, R., W. Y. Wong, et al. (2001). "Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds." Human reproduction **16**(6): 1165-1171.
130. Miller, D. L., E. L. Styer, et al. (2002). "Ultrastructure of the spermatozoa from three odontocetes: a killer whale (*Orcinus orca*), a Pacific white-sided dolphin

- (*Lagenorhynchus obliquidens*) and a beluga (*Delphinapterus leucas*)."
Anatomia, histologia, embryologia **31**(3): 158-168.
131. Miller, J. E. and T. T. Smith (2001). "The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro." Human reproduction **16**(5): 918-924.
 132. Mitchell, V., N. Rives, et al. (2006). "Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities." Human reproduction **21**(8): 2065-2074.
 133. Mochida, K., M. Ohkawa, et al. (2005). "Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures." Theriogenology **64**(1): 135-143.
 134. Moomjy, M., E. S. Sills, et al. (1998). "Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome." Human reproduction **13**(8): 2212-2216.
 135. Moretti, E., N. A. Pascarelli, et al. (2008). "Abnormal elongation of midpiece, absence of axoneme and outer dense fibers at principal piece level, supernumerary microtubules: a sperm defect of possible genetic origin?" Fertility and sterility **90**(4): 1201 e1203-1208.
 136. Morrell, J. M. and H. Rodriguez-Martinez (2010). "Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency." Veterinary medicine international **2011**.
 137. Mortimer, D. and R. Menkveld (2001). "Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions." Journal of andrology **22**(2): 192-205.
 138. Nagy, Z. P., J. Liu, et al. (1995). "The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters." Human reproduction **10**(5): 1123-1129.
 139. Nagy, Z. P., G. Verheyen, et al. (1998). "Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI." Human reproduction **13 Suppl 1**: 143-154.
 140. Ng, S. C., S. L. Liow, et al. (1993). "Review: microinjection of human sperm directly into human oocytes." Journal of assisted reproduction and genetics **10**(5): 337-352.
 141. Nyboe Andersen, A., V. Goossens, et al. (2009). "Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)." Human reproduction **24**(6): 1267-1287.
 142. O'Flynn O'Brien, K. L., A. C. Varghese, et al. (2010). "The genetic causes of male factor infertility: a review." Fertility and sterility **93**(1): 1-12.
 143. Oehninger, S., A. A. Acosta, et al. (1988). "Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities." Fertility and sterility **50**(2): 283-287.
 144. Okabe, M., M. Ikawa, et al. (1998). "Male infertility and the genetics of spermatogenesis." American journal of human genetics **62**(6): 1274-1281.
 145. Olson, G. E., T. D. Noland, et al. (1983). "Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa." Journal of ultrastructure research **85**(2): 204-218.
 146. Ombelet, W., E. Bosmans, et al. (1997). "Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing." Human reproduction **12**(5): 987-993.

147. Ombelet, W., F. L. Fourie, et al. (1994). "Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study." Human reproduction **9**(8): 1479-1484.
148. Palermo, G., H. Joris, et al. (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." Lancet **340**(8810): 17-18.
149. Palermo, G. D., J. Cohen, et al. (1996). "Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure." Fertility and sterility **65**(5): 899-908.
150. Palermo, G. D., P. N. Schlegel, et al. (1999). "Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men." Human reproduction **14**(3): 741-748.
151. Parinaud, J., R. Mieuisset, et al. (1993). "Influence of sperm parameters on embryo quality." Fertility and sterility **60**(5): 888-892.
152. Pasqualotto, F. F., L. M. Rossi-Ferragut, et al. (2002). "Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia." The Journal of urology **167**(4): 1753-1756.
153. Paufler, S. K. and R. H. Foote (1968). "Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides." Journal of reproduction and fertility **17**(1): 125-137.
154. Pedersen, H. (1972). "The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Macaca arctoides*." Journal of ultrastructure research **40**(3): 366-377.
155. Peknicova, J., M. Pexidrova, et al. (2007). "Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermiogram." Fertility and sterility **88**(4 Suppl): 1120-1128.
156. Perez-Crespo, M., P. Moreira, et al. (2008). "Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice." Journal of andrology **29**(1): 47-54.
157. Phadke, A. M. (2008). Clinical atlas of sperm morphology. Tunbridge Wells, Anshan.
158. Porter, M. E. and W. S. Sale (2000). "The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility." The Journal of cell biology **151**(5): F37-42.
159. Racey, P. A. (1972). "Viability of bat spermatozoa after prolonged storage in the epididymis." Journal of reproduction and fertility **28**(2): 309-311.
160. Ragni, G., E. Somigliana, et al. (2004). "Timing of intrauterine insemination: where are we?" Fertility and sterility **82**(1): 25-26; discussion 32-25.
161. Rashid, M. R., F. B. Ong, et al. (2008). "GnRH agonist and GnRH antagonist in intracytoplasmic injection cycles." The Medical journal of Malaysia **63**(2): 113-117.
162. Rawe, V. Y., Y. Terada, et al. (2002). "A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage." Human reproduction **17**(9): 2344-2349.
163. Robb, P. A., J. C. Robins, et al. (2004). "Timing of hCG administration does not affect pregnancy rates in couples undergoing intrauterine insemination using clomiphene citrate." Journal of the National Medical Association **96**(11): 1431-1433.
164. Rolf, C., T. G. Cooper, et al. (1999). "Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study." Human reproduction **14**(4): 1028-1033.
165. Ron-El, R., J. Liu, et al. (1995). "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse." Human reproduction **10**(11): 2831-2834.

166. Roth, C., M. Schricker, et al. (2001). "Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model." The Journal of endocrinology **169**(2): 361-371.
167. Roy, A. and M. M. Matzuk (2006). "Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways." Reproduction **131**(2): 207-219.
168. Rubio, C., M. Gil-Salom, et al. (2001). "Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome." Human reproduction **16**(10): 2084-2092.
169. Rucker, G. B., A. Mielnik, et al. (1998). "Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction." The Journal of urology **160**(6 Pt 1): 2068-2071.
170. Rybouchkin, A., D. Dozortsev, et al. (1996). "Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes." Human reproduction **11**(10): 2170-2175.
171. Ryu, H. M., W. W. Lin, et al. (2001). "Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection." Fertility and sterility **76**(5): 879-883.
172. Salumets, A., A. M. Suikkari, et al. (2002). "Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development." Fertility and sterility **78**(5): 1082-1087.
173. Santti, H., L. Mikkonen, et al. (2005). "Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight." Journal of molecular endocrinology **34**(3): 645-654.
174. Sasagawa, I., O. Ichianagi, et al. (1998). "Round spermatid transfer and embryo development." Archives of andrology **41**(3): 151-157.
175. Sassone-Corsi, P. (2002). "Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis." Science **296**(5576): 2176-2178.
176. Sathananthan, A. H., S. S. Ratnam, et al. (1996). "The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos." Human reproduction **11**(2): 345-356.
177. Shrivastav, P., P. Nadkarni, et al. (1994). "Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia." Human reproduction **9**(11): 2058-2061.
178. Shulman, A., Y. Frenkel, et al. (1998). "The outcome of in-vitro fertilization treatment by egg donation and intracytoplasmic sperm injection for severe male factor infertility: a preliminary report." Human reproduction **13**(8): 2158-2160.
179. Schmid, T. E., B. Eskenazi, et al. (2007). "The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers." Human reproduction **22**(1): 180-187.
180. Schwarz, M. A. and J. K. Koehler (1979). "Alterations in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction." Biology of reproduction **21**(5): 1295-1307.
181. Singh, N. P., C. H. Muller, et al. (2003). "Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm." Fertility and sterility **80**(6): 1420-1430.
182. Slama, R., F. Eustache, et al. (2002). "Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities." Human reproduction **17**(2): 503-515.
183. Stein, P. and R. M. Schultz (2010). "ICSI in the mouse." Methods in enzymology **476**: 251-262.
184. Stenesh, J. (1989). Dictionary of biochemistry and molecular biology, Wiley.

185. Steures, P., J. W. van der Steeg, et al. (2006). "Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial." Lancet **368**(9531): 216-221.
186. Strandell, A., C. Bergh, et al. (2003). "Fallopian tube sperm perfusion: the impact of sperm count and morphology on pregnancy rates." Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica **82**(11): 1023-1029.
187. Suarez, S. S., D. F. Katz, et al. (1983). "Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization." Biology of reproduction **29**(5): 1277-1287.
188. Tadokoro, Y., K. Yomogida, et al. (2002). "Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway." Mechanisms of development **113**(1): 29-39.
189. Tanaka, H., Y. Matsuoka, et al. (2006). "Expression profiles and single-nucleotide polymorphism analysis of human HANP1/H1T2 encoding a histone H1-like protein." International journal of andrology **29**(2): 353-359.
190. Tasdemir, I., M. Tasdemir, et al. (1997). "Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans." Human reproduction **12**(6): 1214-1217.
191. Tournaye, H., P. Devroey, et al. (1994). "Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens." Fertility and sterility **61**(6): 1045-1051.
192. Van Assche, E., M. Bonduelle, et al. (1996). "Cytogenetics of infertile men." Human reproduction **11 Suppl 4**: 1-24; discussion 25-26.
193. Van Voorhis, B. J., M. Barnett, et al. (2001). "Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization." Fertility and sterility **75**(4): 661-668.
194. Van Waart, J., T. F. Kruger, et al. (2001). "Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review." Human reproduction update **7**(5): 495-500.
195. Vicari, E., A. Perdichizzi, et al. (2002). "Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report." Human reproduction **17**(8): 2128-2133.
196. Vilfan, I. D., C. C. Conwell, et al. (2004). "Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine." The Journal of biological chemistry **279**(19): 20088-20095.
197. Viville, S., R. Mollard, et al. (2000). "Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report." Human reproduction **15**(12): 2563-2566.
198. Wall, M. B., K. Marks, et al. (1996). "Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected 'failed-fertilized' human oocytes." Human reproduction **11**(10): 2230-2238.
199. Wildt DE (1992) "Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis." Animal Reproduction Science **18** 247—257
200. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA and Howard JG (1992) "Embryogenesis in conservation biology - or how to make an endangered species embryo." Theriogenology **37** 161—184

201. Wilton, L. J., P. D. Temple-Smith, et al. (1988). "Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis." Fertility and sterility **49**(6): 1052-1058.
202. Woolley, D. M. (1970). "The midpiece of the mouse spermatozoon: its form and development as seen by surface replication." Journal of cell science **6**(3): 865-879.
203. Wright, V. C., J. Chang, et al. (2007). "Assisted reproductive technology surveillance - United States, 2004." MMWR. Surveillance summaries : Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries / CDC **56**(6): 1-22.
204. Wyrobek, A. J., B. Eskenazi, et al. (2006). "Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(25): 9601-9606.
205. Yoshida, N. and A. C. Perry (2007). "Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI)." Nature protocols **2**(2): 296-304.
206. Yue, Z., F. J. Meng, et al. (1995). "Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after in-vitro fertilization." Human reproduction **10**(7): 1781-1785.
207. Zegers-Hochschild, F., K. G. Nygren, et al. (2006). "The ICMART glossary on ART terminology." Human reproduction **21**(8): 1968-1970.
208. Zhang, C., S. Yeh, et al. (2006). "Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(47): 17718-17723.
209. Zhong, C. L., X. H. Xin, et al. (1993). "Inhibition of spermine on calcium influx during capacitation of guinea pig spermatozoa in vitro." Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica **14**(2): 141-144.
210. Zinaman, M. J., C. C. Brown, et al. (2000). "Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples." Journal of andrology **21**(1): 145-153.
211. Zuccarello, D., A. Ferlin, et al. (2008). "Mutations in dynein genes in patients affected by isolated non-syndromic asthenozoospermia." Human reproduction **23**(8): 1957-1962.